

بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی قزوین



معاونت پژوهشی

رساله دوره دکتری تخصصی (Ph.D) در رشته پزشکی مولکولی

عنوان:

بررسی اثر miR-135 بر روی میزان نسبی بیان ژن INSR دخیل در فرایند
مقاومت به انسولین القا شده در سلول عضلانی در محیط *in vitro*

نگارنده: مریم هنردوست

سال ۱۳۹۴

اساتید راهنما: دکتر محمدرضا ساروخانی، دکتر مسعود سلیمانی

استاد مشاور: دکتر احسان عارفیان

محل اجرا: دانشگاه علوم پزشکی قزوین-مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته



و زاده شدم از دل دو ماهی

که عاشق دریا بودند

حالا

دلم دریاست

و عاشق ماهی هایی ست

که عاشق دریا بودند...

تقدیم به مهربانی همه عزیزانم...

سپاس‌گزاری

در مسیر انجام این پژوهش همواره از راهنمایی‌ها و کمک‌های علمی و عملی اساتید بزرگوارم آقایان دکتر محمدرضا ساروخانی، دکتر مسعود سلیمانی و دکتر احسان عارفیان برخوردار بوده‌ام که لازم می‌دانم از بذل توجه ایشان کمال تشکر را داشته باشم.

از راهنمایی‌ها و مشاورت علمی و دلسوزانه و مساعدت عملی سرکار خانم‌ها دکتر سمیرا محمدی یگانه، دکتر فاطمه کوهکن، دکتر سارا صعودی، دکتر سحر مقبلی نژاد و دکتر بهاره ربانی و جناب آقای دکتر شهریار عرب در مسیر انجام این پایان‌نامه تشکر می‌کنم.

همچنین از جناب آقایان دکتر بهرام کاظمی، دکتر تقی ناصر پور و سرکارخانم دکتر سمیرا محمدی یگانه به خاطر راهنمایی‌ها و قبول زحمت داوری این پایان‌نامه کمال تشکر را دارم.

در مسیر انجام این پایان‌نامه همواره از همکاری علمی و پژوهشی دوستان عزیزم خانم‌ها: رضوان توکلی، آتنا حجاری‌زاده، منصوره برزگر آقایان: آقای دکتر مهدی پریان و علی رحیمیان مشهدی بهره‌مند بوده‌ام بدین وسیله از تمامی این عزیزان تشکر می‌نمایم.

و در نهایت لازم می‌دانم از حسن نظر و همکاری صمیمانه کلیه پرسنل و مدیریت مرکز تحقیقات فناوری بن-یاخته و اساتید بخش پزشکی مولکولی و پرسنل دانشگاه علوم پزشکی قزوین کمال تشکر را داشته باشم.

بخشی از این پایان‌نامه در مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته و با حمایت مالی آن مرکز انجام شده- است که بدین وسیله از همکاری این مرکز کمال تشکر را دارد.

چکیده

زمینه: دیابت نوع دو اصلی ترین عارضه متابولیکی شناخته شده و در حال حاضر به عنوان یکی از مشکلات اساسی چرخه سلامت و درمان به شمار می رود. پاتولوژی بیماری دیابت نوع دو بسیار پیچیده بوده و تلفیقی از بهم ریختگی تنظیم میزان قند خون به علت ایجاد جالتمقاومت به انسولین و یا کمبود میزان انسولین می باشد. microRNA ها گروه جدیدی از RNAs های کوچک تنظیمی هستند که در بسیاری از فرایندهای بیولوژیک دخالت دارند. ارتباط میان تغییرات ژنتیکی با پایه microRNA و بروز بیماری های انسانی نظیر دیابت نوع دو به اثبات رسیده

هدف: در این مطالعه به بررسی نقش microRNA پیشبینی شده و ژن هدف آن در فرایند ایجاد مقاومت به انسولین خواهیم پرداخت. زیرا مقاومت به انسولین عضلانی به عنوان فاکتور خطر مهم و اساسی ایجاد بیماری دیابت نوع دو شناخته شده است.

مواد و روش ها: با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک miR-135 و ژن هدف آن -ژن رسپتور انسولین-INSR به عنوان فاکتور های بالقوه ایجاد مقاومت به انسولین در سلول های عضله انتخاب شدند. سلول های C2C12 تحت شرایط محیطی حاوی ۳٪ سرم اسب تمایز یافتند. مرحله تمایز سلولی با تست های ایمونو سیتو شیمی و real time PCR کمی به اثبات رسید. مدل سلولی مقاومت به انسولین با روش افزایش میزان انسولین به حالت مزمن روی C2C12 انجام پذیرفت و توسط تست جذب قند تایید گردید. پس از ساختن وکتور بیانی حاوی miR-135 سلولها با این وکتور ترنسفکت شده و سپس جذب قند و میزان بیان miRNA و ژن هدف آن سنجیده شد.

یافته ها: بیان ژن INSR به صورت کاملاً واضح و معنی دار در سلول های ترنسفکت شده با miR-135 کاهش یافته بود. از سوی دیگر جذب قند سلول های ترنسفکت شده با miR-135 به صورت کاملاً معنی دار با سلول های کنترل متفاوت بود و با نتایج جذب قند سلول های مقاوم به انسولین مشابه هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان داد که میزان کاهش یافته بیان INSR و افزایش بیان miR-135 باعث

کاهش میزان جذب قند تحریک شده با انسولین شده و به ایجاد فنوتیپ مقاومت به انسولین منجر می گردد.

کلیدواژه‌ها: مقاومت به انسولین، miR-135، رسپتور انسولین

چکیده

فصل اول - مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده

- ۴-۱- دیابت شیرین
- ۵-۲-۱- انواع بیماری دیابت
- ۵-۲-۱-۱- دیابت نوع یک
- ۵-۲-۱-۲- دیابت نوع دو
- ۵-۲-۱-۳- دیابت حاملگی
- ۶-۲-۱-۴- دیابت با علل متفرقه
- ۶-۳-۱- مروری بر دیابت نوع دو و عوامل دخیل در بروز آن از دیدگاه مولکولی
- ۱۰-۴-۱- تفاوت دیابت نوع یک و نوع دو
- ۱۱-۵-۱- تشخیص دیابت
- ۱۲-۶-۱- درمان دیابت نوع دو
- ۱۲-۱-۶-۱- داروهایی که اختلال کارکرد سلول‌های بتا را هدف می‌گیرند
- ۱۲-۱-۶-۱-۱- درمان‌های جدید مبتنی بر انسولین‌افزاها
- ۱۳-۱-۶-۲- محرک‌های غیر انسولین‌افزای سلول‌های بتا
- ۱۳-۲-۶-۱- داروهایی که اختلال کارکرد سلول‌های آلفا را هدف می‌گیرند
- ۱۴-۳-۶-۱- افزاینده‌های عملکرد انسولین
- ۱۴-۴-۶-۱- داروهایی که مسیرهای غیروابسته به انسولین را هدف می‌گیرند
- ۱۴-۱-۴-۶-۱- مهارکننده‌های انتقال‌دهنده همزمان سدیم- گلوکز (SGLT2)
- ۱۵-۲-۴-۶-۱- اهداف کبدی
- ۱۵-۵-۶-۱- داروهایی که نشانگان متابولیک را هدف می‌گیرند
- ۱۵-۱-۵-۶-۱- آنتاگونیست‌های GIP
- ۱۶-۲-۵-۶-۱- تعدیل‌کننده‌های PPAR
- ۱۶-۶-۶-۱- داروهای با مکانیسم‌های ناشناخته
- ۱۶-۱-۶-۶-۱- آگونیست‌های گیرنده D2 دوپامین
- ۱۶-۲-۶-۶-۱- جداکننده‌های اسیدهای صفراوی
- ۱۷-۷-۶-۱- جراحی
- ۱۷-۷-۱- مکانیسم مولکولی آغاز کننده بیماری دیابت نوع دو
- ۱۷-۷-۱- مقاومت به انسولین اولین مرحله ایجاد بیماری

۱۷	۱-۱-۷-۱- مکانیسم های مولکولی ایجاد مقاومت به انسولین
۱۸	۱-۱-۷-۱- اختلال در نقل و انتقال مولکول GLUT4
۲۰	۱-۱-۷-۲- چاقی و چربی های احشایی
۲۰	۱-۱-۷-۳- چربی ، تغذیه و فعال شدن مسیر mTOR
۲۲	۱-۱-۷-۴- پروتئین کیناز C اتیپیکال (aPKC)
۲۳	۱-۱-۷-۵- ادیپوکاین ها: سیتوکین های مترشحه از بافت چربی
۲۳	۱-۱-۷-۶- کیناز Rho ROCK
۲۳	۱-۱-۷-۷- مولکول های پروتئین فسفاتاز و لیپید فسفاتاز
۲۴	۸-۱- زیست شناسی microRNA ها
۲۶	۸-۱- بیوسنتز و مکانیزم عمل میکرو RNA
۲۹	۸-۲- مقایسه میکرو RNA با RNA کوچک مداخله گر
۳۰	۸-۳- روش های شناسایی میکرو RNA ها
۳۱	۸-۳-۱- کلونینگ مستقیم
۳۱	۸-۳-۲- جستجوی ژنوم با استفاده از رایانه
۳۲	۸-۳-۳- جستجوی میکرو RNA ها با استفاده از تکنیک میکرو اری در گونه های مختلف
	۸-۳-۴- ساخت miRNA به صورت آزمایشگاهی و هدف قرار دادن
۳۲	توالی های شناخته شده ژن
۳۳	۹-۱- نقش miRNA در دیابت نوع دو
۳۴	۱۰-۱- اهمیت موضوع و ضرورت انجام تحقیق

فصل دوم : مواد و روش ها

۳۸	۱-۲- اهداف طرح
۳۸	۱-۱-۲- هدف اصلی
۳۸	۲-۱-۲- اهداف فرعی
۳۸	۳-۱-۲- اهداف کاربردی
۳۸	۱-۲-۲- فرضیات
۳۹	۳-۲- متغیرها

فصل سوم : مواد و روش ها

۴۱	۱-۳-مواد مورد استفاده
۴۱	۱-۱-۳-آنزیم ها
۴۱	۱-۲-۳- محیط های کشت
۴۲	۱-۳-۳-آنتی بیوتیک ها
۴۲	۱-۳-۴-کیت ها
۴۳	۱-۳-۵-سلول ها
۴۳	۱-۳-۶-مواد لازم برای ایمونوفلورسانس
۴۳	۱-۳-۷-سایر مواد
۴۴	۱-۳-۸-بافر ها
۴۴	۱-۳-۸-۱-بافر نمکی PBS فاقد کلسیم / منیزیم
۴۴	۱-۳-۸-۲-محلول تریپسین – EDTA
۴۵	۱-۳-۹-وسایل یک بار مصرف
۴۵	۱-۳-۱۰-دستگاه ها
۴۵	۱-۳-۱۱- وکتورهای مورد استفاده
۴۷	۳-۲- روش کار
۴۸	۲-۲-۱- مطالعات بیوانفورماتیک در فاز پیش مطالعاتی
۴۸	۲-۱-۱- جستجوی ژن مناسب وپیش بینی miRNA هدف گیرنده 3' UTR آن
۴۹	۲-۱-۱-۱- نرم افزار Target Scan
۵۰	۲-۱-۱-۲- نرم افزار miRWalk
۵۰	۲-۱-۱-۳- نرم افزار miRanda
۵۰	۲-۱-۱-۴- نرم افزار Diana-microT
۵۱	۳-۳-تهیه سازه ژنی مورد نیاز
۵۱	۳-۱-۳-استخراج DNA از بافت موش و تکثیر ژن miRNA
۵۱	۳-۲-۳-کلون کردن miRNA در وکتور T/A
۵۱	۳-۲-۱- فرایند PCR
۵۱	۳-۲-۵-طراحی پرایمر برای PCR
۵۳	۳-۲-۲-آشکارسازی محصولات روی ژل و تخلیص از ژل
۵۵	۳-۲-۳-اتصال وکتور T/A به قطعه تخلیص شده
۵۵	۳-۲-۴-مستعد نمودن باکتری با روش شیمیایی و ترانسفورماسیون

- ۵۷ ۵-۳-۳-۵-انجام واکنش کلونی PCR برای تأیید ورود وکتور T/A حاوی قطعات به باکتری
- ۵۸ ۶-۳-۳-۶-تخلیص پلاسمید از باکتری ترانسفورم شده
- ۵۹ ۷-۳-۳-۷-آشکار سازی محصولات استخراج شده (پلاسمید) با الکتروفورز روی ژل آگارز
- ۵۹ ۸-۳-۳-۸-تهیه نمونه های ذخیره از باکتریهای ترانسفورم شده مثبت
- ۶۰ ۱-۳-۳-۱-کلون کردن miRNA در وکتور pCDH
- ۶۰ ۲-۳-۳-۲-انجام واکنش کلونی PCR برای تأیید ورود قطعات به وکتور
- ۳-۳-۳-۳-تخلیص پلاسمید از باکتری ترانسفورم شده و آشکار سازی محصولات استخراج شده (پلاسمید) با آگاروز ژل الکتروفورز
- ۶۱ ۴-۳-۳-۴-بررسی نتایج به دست آمده از توالی یابی
- ۶۲ ۴-۳-۴-۴-کشت سلول یوکاریوت
- ۶۲ ۱-۴-۳-۱-لایین سلولی
- ۶۳ ۱-۱-۴-۳-پاساژ یاخته های منجمد و ذوب کردن سلول
- ۶۳ ۲-۱-۴-۳-شمارش سلولی
- ۶۴ ۳-۱-۴-۳-کشت مجدد سلول
- ۶۴ ۴-۱-۴-۳-انجماد یاخته ها
- ۷۰ ۲-۴-۳-۲-تمایز سلول های C2 C12
- ۶۵ ۱-۲-۴-۳-ارزیابی تمایز سلول های C2 C12 با تعیین بیان پروتئین های فاز تمایزی
- ۶۶ با استفاده از تکنیک ایمنوسیتوشیمی
- ۶۷ ۲-۲-۴-۳-ایجاد حالت مقاومت به انسولین در سلول های C2 C12
- ۶۷ ۱-۵-۳-۱-ارزیابی میزان جذب قند
- ۷۰ ۱-۶-۳-۱-ترانسفکشن سلول یوکاریوت
- ۷۰ ۱-۱-۶-۳-آماده سازی سلول ها جهت ترنسفکشن
- ۷۰ ۲-۱-۶-۳-ترانسفکشن به روش لیپوفکتامین
- ۷۱ ۷-۳-۷-۷-بررسی بیان ژن های هدف توسط Real-Time PCR.
- ۷۱ ۱-۷-۳-۱-استخراج Total RNA
- ۷۲ ۲-۷-۳-۲-کنترل کیفیت RNA استخراج شده
- ۷۳ ۳-۷-۳-۳-انجام واکنش RT-PCR
- ۷۳ ۱-۳-۷-۳-ساخت cDNA برای بررسی میزان بیان ژن ها
- ۷۵ ۴-۷-۳-۴-انجام واکنش Real-Time PCR برای بررسی بیان ژنها

۷۸	۱-۴-۷-۳ بررسی بیان mRNA های فاز پایه و تمایزی در سلولهای C12 جهت
۷۸	اثبات حالت تمایزی با روش Real-Time PCR
۷۸	۲-۴-۷-۳ بررسی بیان miRNA در رده سلولی با روش PCR Real-Time
۷۸	۳-۴-۷-۳ بررسی بیان ژن INSR در رده سلولی با روش Real-Time PCR
۷۹	۵-۷-۳ مقایسه نسبی بیان ژن ها
۷۹	۱-۵-۷-۳ آنالیز آماری
۷۹	۲-۵-۷-۳ REST با آنالیز نتایج
	۶-۷-۳ آنالیز داده های خام microarray سه پژوهش ثبت شده
۸۰	و مقایسه نتایج آنها با نتایج این پروژه

فصل چهارم

۸۲	۱-۴ نتایج مطالعات بیوانفورماتیک در مرحله پیش مطالعاتی
۸۲	۱-۱-۴ پیش بینی هدف گیری ژن INSR با miR- 135 در نرم افزار TargetScan
۸۴	۲-۱-۴ پیش بینی هدف گیری ژن INSR با miR- 135 در نرم افزار های دیگر
۸۵	۲-۴ طراحی پرایمر ها
۸۷	۳-۴ کلون کردن با miR- 135
۸۷	۱-۳-۴ استخراج DNA و تایید آن با β actin PCR
۸۷	۲-۳-۴ کلون با miR-- 135 در وکتور T/A
۸۹	۳-۳-۴ وارد کردن قطعات به داخل وکتور T/A و تایید کلنی های TA با روش colony PCR
۹۰	۴-۳-۴ تایید کلنی های T/A با هضم آنزیمی وکتور TA-vector-miR135 با XbaI/ BamHI
۹۱	۴-۴ ورود قطعه با miR- 135 به وکتور pCDH
۹۱	۱-۴-۴ استخراج با miR- 135 از وکتور T/A به منظور وارد کردن قطعات به داخل وکتور pCDH
۹۲	۲-۴-۴ هضم وکتور pCDH با آنزیمهای BamHI/XbaI جهت اتصال با miR- 135 به وکتور
۹۳	۳-۴-۴ وارد کردن قطعات به داخل وکتور pCDH و تایید کلنی های با miR-135-pCDH
۹۴	با روش colony PC R
۹۴	۴-۴-۴ تایید سازه محتوی ژن pCDH- با miR- 135
۹۶	۱-۴-۴-۴ تایید پلاسمیدهای pCDH- با miR- 135 با هضم آنزیمی و توالی یابی

- ۹۶ ۵-۴- نتایج تایید تمایز سلولهای C2 C12
- ۹۶ ۵-۴-۱- نتایج حاصل از ایمنوسیتوشیمی بر روی سلول های C2 C12
- ۵-۴-۲- ارزیابی بیان mRNA های فاز پایه و تمایزی در سلولهای C2 C12 جهت اثبات
- ۹۸ حالت تمایزی با روش PCR Real-Time
- ۵-۴-۶- بیان ژن INSR در رده سلولی تمایز یافته در مقایسه با حالت تمایز نیافته
- ۹۹ در آنالیز با نرم افزار REST
- ۵-۴-۷- به دست آوردن میزان مناسب انسولین مورد استفاده به
- ۱۰۰ منظور ایجاد حالت مقاومت به انسولین
- ۵-۴-۸- ارزیابی میزان جذب قند در سلولهای نرمال و سلولهای مقاوم به انسولین
- ۵-۴-۹- ترانسفکت سلولهای C2 C12 با وکتور pCDH و انجام PCR Real-Time.
- ۱۰۴ و ارزیابی اثر بیان miRNA بر ژن هدف
- ۵-۴-۱۰- ارزیابی بیان ژن های هدف توسط Real-Time PCR
- ۵-۴-۱۰-۱- ارزیابی بیان با miR- 135 و INSR در رده سلولی با روش PCR Real-Time
- ۵-۴-۱۰-۲- تایید بیان با miR- 135 در سلولهای ترنسفکت شده با روش PCR- Real-Time.
- ۵-۴-۱۰-۳- ارزیابی اثر با miR- 135 بر روی سطح mRNA می ژن INSR
- ۵-۴-۱۱- ارزیابی میزان جذب قند در سلولهای ترنسفکت شده با miR- 135
- ۵-۴-۱۲- مقایسه نتایج کسب شده در این پژوهش با نتایج micro array ثبت شده
- ۱۱۱ در GEO database
- ۵-۴-۱۲-۱- مقایسه نتایج کسب شده در مرحله تمایزی سلولهای C2 C12 با نتایج micro array با شماره ثبت GEO accession # ۴۶۹۴GSE
- ۵-۴-۱۲-۲- مقایسه نتایج کسب شده مرحله مقاومت به انسولین در شرایط invitro روی سلولهای C2C12 با نتایج micro array در مرحله مقاومت به انسولین با شماره ثبت GEO accession # ۶۷۹۸GSE و مرحله دیابت نوع دو با شماره ثبت GEO accession # ۲۶۱۶۸GSE

فصل پنجم

- ۱۱۷ ۵-۱- بحث
- ۱۲۵ ۵-۲- نتیجه گیری
- ۱۲۵ ۵-۳- پیشنهادها

فهرست شکل ها

فصل اول

- شکل ۱-۱: متابولیسم دیابت: مراحل ایجاد بیماری و عوارض آن ۴
- شکل ۱-۲: نقش پانکراس در ایجاد بیماری دیابت نوع دو ۶
- شکل ۱-۳: ارتباط میان چاقی و ابتلا به بیماری دیابت نوع دو ۷
- شکل ۱-۴: عوامل موثر بر ایجاد بیماری دیابت نوع دو ۸
- شکل ۱-۵: علائم و عوارض دیابت نوع دو ۹
- شکل ۱-۶: تفاوت میان دیابت نوع یک و نوع دو ۱۰
- شکل ۱-۷: مسیر پیام رسانی هورمون انسولین در بافت های هدف ۱۸
- شکل ۱-۸: جذب قند موجود در خون توسط ناقلین GLUT4 در پاسخ به ترشح هورمون انسولین ۱۹
- شکل ۱-۹: واسطه های مولکولی دخیل در ایجاد فرایند مقاومت به انسولین در بافت هدف و مسیر مهار کننده بیماری ۲۲
- شکل ۱-۱۰: بیوسنتز و مکانیزم عمل میکرو RNA ۲۶
- شکل ۱-۱۱: انواع مهار ژن توسط میکرو RNA ۲۸
- شکل ۱-۱۲: نمایی از miRNA دخیل در پروسه ایجاد مقاومت به انسولین و اهداف مولکولی آنها ۳۴

فصل سوم

- شکل ۱-۳: نقشه وکتور استفاده شده در پژوهش ۴۶
- شکل ۲-۳: مسیر بیماریزایی دیابت نوع دو برگرفته شده از سایت KEGG ۴۹
- شکل ۳-۳: زمانبندی تمایز سلولهای عضلانی و میزان بیان ژنها ۶۶
- شکل ۳-۴: نحوه عملکرد پرایمر های stem loop در تکثیر miRNA ۷۴

فصل چهارم

- شکل ۱-۴: نتایج هدف گیری ژن INSR با miR-135 با نرم افزار TargetScan ۸۳
- شکل ۲-۴: استخراج DNA از بافت کبد موشی و انجام PCR با پرایمر کنترل β actin موشی جهت تایید مراحل استخراج ۸۷
- شکل ۳-۴: نتایج PCR برای کلون miR-135 با آنزیم Pfu polymerase ۸۸
- شکل ۴-۴: نتایج انجام واکنش Colony PCR با پرایمر های F- M13/-R universal برای تأیید ورود وکتور T/A حاوی miR-135 به باکتری. ۸۹
- شکل ۴-۵: هضم وکتور TA و خروج قطعه miR-135 با آنزیمهای BamHI/XbaI ۹۰
- شکل ۴-۶: هضم وکتور TA و خروج قطعه miR-135 با آنزیمهای BamHI/XbaI جهت اتصال به ۹۱

پلاسمید pCDH

- شکل ۴-۷: هضم آنزیمی وکتور pCDH با آنزیمهای BamHI/XbaI پلاسمید برش و غیر برش ۹۲
- شکل ۴-۸: وکتور pCDH هضم شده و miR-135 استخراج شده از وکتور TA آماده اتصال ۹۳
- شکل ۴-۹: نتایج انجام واکنش Colony PCR برای تأیید ورود وکتور pCDH حاوی قطعات miR-135 به باکتری ۹۴
- شکل ۴-۱۰: تأیید کلون های miRNA از طریق هضم آنزیمی با BamHI/XbaI ۹۵
- شکل ۴-۱۱: بررسی نتایج بدست آمده از توالی یابی miRNA کلون شده با توالی ژنومیک آن ۹۶
- شکل ۴-۱۲: مراحل تمایز سلولهای C2C12 از حالت پایه میوبلاستی به حالت تمایز یافته ۹۷
- شکل ۴-۱۳: ایمنوسیتوشیمی پروتئین pax-7 (فاکتور اختصاصی سلولهای تمایز نیافته) و پروتئین میوزین (فاکتور اختصاصی سلولهای تمایز یافته). ۹۷
- شکل ۴-۱۴: به دست آوردن غلظت مناسب انسولین مورد استفاده در مرحله ایجاد مقاومت به انسولین در سلولهای C2C12 ۱۰۱
- شکل ۴-۱۵: ترانسفکت سلولهای C2C12 با وکتور pCDH به عنوان کنترل نرمال ۱۰۵
- شکل ۴-۱۶: ترانسفکت سلولهای C2C12 با وکتور pCDH حاوی miR-135 ۱۰۵

فصل پنجم

- شکل ۵-۱: نتایج بررسی های بیوانفورماتیک جهت بررسی ژنهای کاندید ایجاد مرحله مقاومت به انسولین. ۱۱۸
- شکل ۵-۲: مراحل تمایز سلولهای پایه میوبلاستی به حالت تمایز یافته در بافت عضلانی ۱۲۱

فهرست جدول ها

فصل دوم

جدول ۱-۲: متغیرهای مورد آزمایش، تعریف علمی هریک و مقیاس اندازه گیری آن ها ۳۹

فصل سوم

- جدول ۱-۳: آنزیمهای مورد نیاز PCR و RT-PCR و Real-Time PCR ۴۱
- جدول ۲-۳: مقادیر مورد استفاده جهت انجام PCR قطعه حاوی ژن miR-135 ۵۲
- جدول ۳-۳: برنامه سیکلهای واکنش PCR ۵۲
- جدول ۴-۳: اجزای مورد نیاز برای واکنش اتصال ۵۵
- جدول ۵-۳: اجزای لازم جهت انجام واکنش کلونی PCR ۵۷
- جدول ۶-۳: سیکلهای واکنش کلونی PCR ۵۸
- جدول ۷-۳: اجزای مورد نیاز برای واکنش اتصال ۶۰
- جدول ۸-۳: سیکلهای واکنش کلونی PCR ۶۱
- جدول ۹-۳: گروه بندی سلولها در ازمون ارزیابی جذب قند ۶۹
- جدول ۱۰-۳: مواد مورد نیاز برای واکنش ساخت cDNA ۷۴
- جدول ۱۱-۳: شرایط دمایی واکنش ساخت cDNA ۷۵
- جدول ۱۲-۳: اجزای لازم برای واکنش Real-Time PCR در دستگاه Rotorgen 6000 (corbet) ۷۶
- جدول ۱۳-۳: برنامه زمانی مراحل واکنش Real-Time PCR ژن ها ۷۶
- جدول ۱۴-۳: برنامه زمانی Melting ۷۷
- جدول ۱۵-۳: برنامه زمانی مراحل واکنش Real-Time qPCR برای miRNA ۷۷

فصل چهارم

- جدول ۱-۴: نتایج هدف گیری ژن INSR توسط miR-135 در نرم افزار های miRWalk , Trgetscan , miRanda , DIANA mT و miRDB ۸۵
- جدول ۲-۴: پرایمر های طراحی شده جهت انجام مراحل کلونینگ miR-135 ۸۵
- جدول ۳-۴: توالی پرایمرها ی طراحی شده برای ردیابی ۸۶
- جدول ۴-۴: توالی پرایمرها ی طراحی شده برای ردیابی INSR ۸۶
- جدول ۵-۴: نتایج آنالیز آماری انجام شده توسط نرم افزار REST و ارزیابی بیان mRNA های ژن Pax و myoD فاز پایه و تمایزی در سلولهای C2C12 ۹۸

۹۹	جدول ۴-۶: نتایج آنالیز آماری انجام شده توسط نرم افزار REST و ارزیابی بیان ن ژن INSR در رده سلولی تمایز یافته در مقایسه با حالت تمایز نیافت در سلولهای C2C12
۱۰۲	جدول ۴-۷: نتایج ارزیابی میزان قند محیط مورد استفاده در آزمون جذب قند
۱۰۲	جدول ۴-۸: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای کنترل مثبت در آزمون جذب قند
۱۰۲	جدول ۴-۹: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای کنترل منفی در آزمون جذب قند
۱۰۳	جدول ۴-۱۰: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای مقاوم به انسولین در آزمون جذب قند
۱۰۷	جدول ۴-۱۱: نتایج Real-Time PCR بیان miR135 در رده سلولی C2C12 ترنسفکت شده miR135-pCDH با در آنالیز با نرم افزار REST
۱۰۹	جدول ۴-۱۲: نتایج Real-Time PCR بیان INSR در رده سلولی C2C12 ترنسفکت شده miR135-pCDH با در آنالیز با نرم افزار REST
۱۱۰	جدول ۴-۱۳: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای ترنسفکت شده در آزمون جذب قند
۱۱۰	جدول ۴-۱۴: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای ترنسفکت شده و سلولهای کنترل مثبت و کنترل منفی و مقاوم به انسولین در آزمون جذب قند
۱۱۲	جدول ۴-۱۵: بررسی آماری نتایج خام حاصل از مطالعه با شماره ثبت شده GEO accession #GSE4694 با استفاده از نرم افزار SPSS و انجام آزمون paired t-test
۱۱۴	جدول ۴-۱۶: بررسی آماری نتایج خام حاصل از مطالعه با شماره ثبت شده GEO accession #GSE6798 با استفاده از نرم افزار SPSS و انجام آزمون paired t-test
۱۱۴	جدول ۴-۱۷: بررسی آماری نتایج خام حاصل از مطالعه با شماره ثبت شده GEO accession #GSE26168 با استفاده از نرم افزار SPSS و انجام آزمون paired t-test

فهرست نمودار ها

فصل چهارم

- ۹۹ نمودار ۴-۱. نتایج Real Time PCR نسبی بیان ژنهای pax7 و myoD
- ۱۰۰ نمودار ۴-۲. نتایج Real Time PCR نسبی بیان ژن INSR
- ۱۰۴ نمودار ۴-۳: نتایج ازمون جذب قند در حالات مختلف سلولهای C2C12 بر اساس mg/dl
- ۱۰۸ نمودار ۴-۴. نتایج Real Time PCR نسبی بیان miR-135 پس از ترنسفکشن
- ۱۰۹ نمودار ۴-۵. نتایج Real Time PCR نسبی بیان ژن INSR متاثر از بیان miR-135
- نمودار ۴-۶: نتایج میزان جذب قند در سلولهای ترنسفکت شده با miR-135 و مقایسه ان با حالات مختلف سلولهای C2C12 ترنسفکت نشده
- ۱۱۱
- نمودار ۴-۷: مقایسه نتایج میزان بیان ژن INSR در سلولهای تمایز یافته نسبت به حالت پایه ارزیابی شده توسط روش Real time پژوهش ما و روش microarray
- ۱۱۲
- نمودار ۴-۸: مقایسه نتایج میزان بیان ژن INSR اندازه گیری شده توسط روش Real time پژوهش ما و روش microarray در نمونه های سلولی و بافتی مبتلا به مقاومت به انسولین
- ۱۱۵

فصل اول

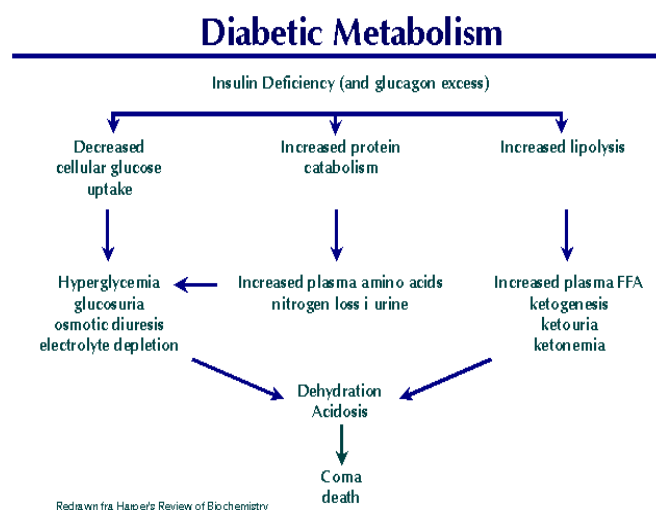
مقدمه و مروری بر مطالعات پیشین

۱- مقدمه ، مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱- دیابت شیرین:

از هزاران سال پیش، علائمی نظیر پرنوشی، پرخوری و پراذراری توجه پزشکان را به بیماری قند معطوف کرد.^۵ است. دیابت شیرین به عنوان شایع ترین بیماری اندوکراین شامل گروهی از اختلالات متابولیک شایع (کمبود یا فقدان انسولین، و زیادی نسبی یا مطلق گلوکاگن) است که وجه مشترک آنها در فنوتیپ هایپرگلاسمیک^۱ می باشد(۱). چند نوع مشخص و مجزای دیابت شیرین وجود دارد که بر اثر واکنش های پیچیده ایی بین عوامل ژنتیکی ، محیطی و شیوه زندگی به وجود می آیند. بر حسب اتیولوژی بیماری، عوامل دخیل در بروز هایپر گلاسمی عبارتند از: کاهش ترشح انسولین، کاهش مصرف گلوکز و افزایش تولید گلوکز.

بیش از یک سوم بیماران دیابتی دچار عوارض جدی چشمی، کلیوی، عصبی، عروق خونی و قلبی می شوند(۲،۱). با افزایش شیوع دیابت در سراسر جهان انتظار می رود این بیماری همچنان یکی از عوامل اصلی بیماریزایی و مرگ و میر باقی بماند (شکل ۱-۱). (۳)



شکل ۱-۱: متابولیسم دیابت: مراحل ایجاد بیماری و عوارض آن

¹Hyperglysemic

۱-۲- انواع بیماری دیابت

به طور کلی دیابت به چهار گروه دیابت نوع یک، دیابت نوع دو^۲، دیابت حاملگی و دیابت به علل متفرقه تقسیم بندی می شود.

۱-۲-۱- دیابت نوع یک:

در دیابت نوع یک که ۱۵-۱۰ درصد کل موارد دیابت را تشکیل می دهد، تولید انسولین از پانکراس به علت از بین رفتن سلولهای سازنده ی انسولین، متوقف می شود. در این نوع از دیابت تخریب سلولی سلولهای بتا در پانکراس اتفاق می افتد و پانکراس هیچ انسولینی ترشح نمی کند. انسولین هورمونی است که بدن را قادر می سازد تا گلوکز موجود در غذا را به انرژی تبدیل کند هرچند دلیل اصلی ابتلاء به دیابت نوع ۱ نامعلوم است، اما در اکثر افراد مبتلا، سیستم ایمنی بدن شروع به نابود کردن سلول های سازنده ی انسولین درون پانکراس می کند. ژنتیک و ویروس هایی خاص می توانند از عوامل این واکنش غیرعادی سیستم ایمنی باشند افراد مبتلا به این نوع دیابت باید از بدو تشخیص، انسولین مورد نیاز بدن را به صورت تزریقات روزانه تأمین می کنند. به همین دلیل به آن "دیابت وابسته به انسولین" نیز می گویند. دیابت نوع یک اغلب در سنین زیر ۳۰ سال به وجود می آید، لذا به آن "دیابت جوانی" نیز می گویند(۴).

۱-۲-۲- دیابت نوع دو:

دیابت نوع دو بیشتر در بالغین بالای ۳۰ سال و چاق دیده می شود که ۹۰-۸۵ درصد کل موارد دیابت را شامل می گردد. انسولین تولید شده از پانکراس در این افراد به خوبی عمل نمی کند. در واقع یا پانکراس به اندازه ی کافی انسولین ترشح نمی کند و یا این که انسولین ترشح شده، به علت وجود مقاومت سلول ها به انسولین مخصوصاً در افراد چاق، فاقد کارآیی لازم است (۵). به این نوع دیابت، "دیابت غیر وابسته به انسولین" یا "دیابت بزرگسالان" نیز می گویند(شکل ۱-۲).

۱-۲-۳- دیابت حاملگی:

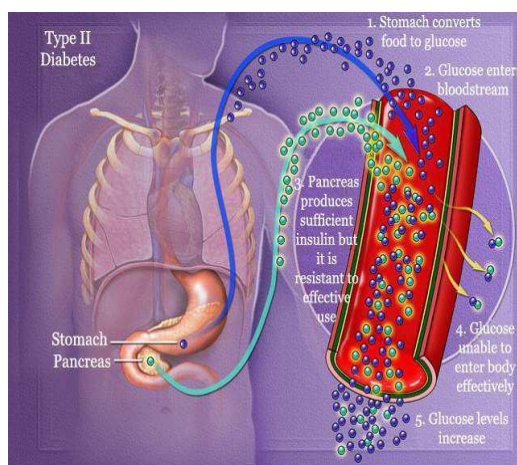
دیابت حاملگی به دیابتی گفته می شود که برای اولین بار در طول حاملگی تشخیص داده شود. این نوع دیابت معمولاً گذراست و بعد از اتمام حاملگی بهبود می یابد. خانم‌های مبتلا به دیابت حاملگی بعداً در معرض خطر ابتلا به دیابت نوع دو هستند(۶).

۱-۲-۴- دیابت با علل متفرقه:

از علل متفرقه ی دیابت می توان به جراحی، داروها (مثل کورتیکواستروئیدها)، سوء تغذیه و عفونت اشاره کرد (۶).

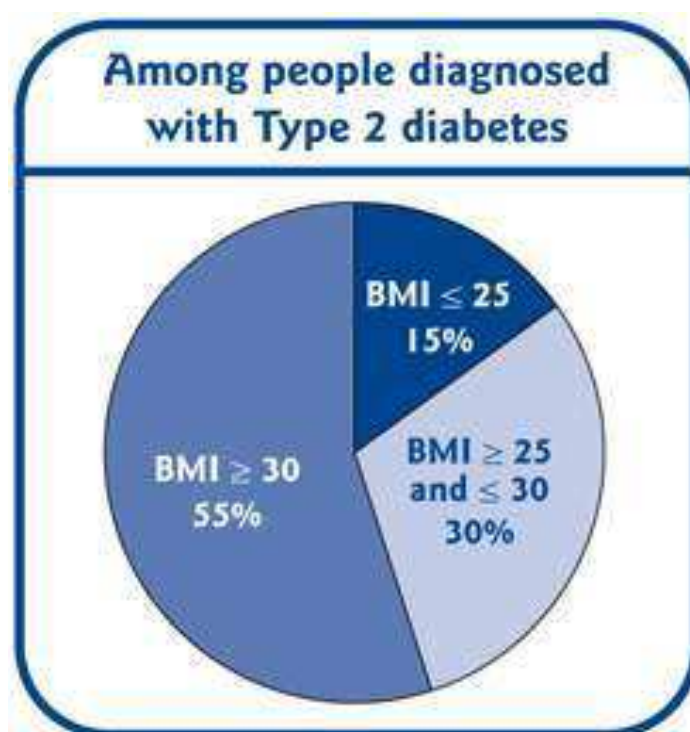
۱-۳- مروری بر دیابت نوع دو و عوامل دخیل در بروز آن از دیدگاه مولکولی

دیابت نوع دو شامل گروه نا همگونی از اختلالات است که معمولاً با درجات متفاوتی از مقاومت به انسولین (در بافت های هدف انسولین)، اختلال در ترشح انسولین و افزایش تولید گلوکز مشخص می شود (۷،۸) که به دلیل عملکرد نا مناسب سلولهای پانکراس و ناکافی بودن میزان انسولین اتفاق می افتد(شکل ۱- ۲) (۹،۷). قبل از بروز دیابت نوع دو دوره ایی از هومئوستاز غیر طبیعی گلوکز وجود دارد. میزان انسولین افراد بیمار در حد طبیعی و یا بالاتر بوده، اما کمتر از حد گلوکز پلاسماست که نشانگر کمبود نسبی انسولین و یا نقص در ترشح آن است(۱).



شکل ۱-۲: نقش پانکراس در ایجاد بیماری دیابت نوع دو

با توجه به شیوع چاقی و کاهش میزان فعالیت بدنی انتظار می رود سرعت وقوع دیابت دو بیش از نوع یک باشد (شکل ۳-۱). تنوع جغرافیایی قابل ملاحظه ایی در میزان بروز هر دو نوع دیابت دیده می شود. وقوع دیابت دو در برخی جزایر اقیانوس آرام زیاد و در هند و امریکا متوسط بوده اما در روسیه و چین نسبتاً کم است. تا سال ۲۰۱۰ نزدیک به ۲۲۰ میلیون نفر مبتلا به دیابت نوع ۲ گزارش شده اند که نسب به سال ۲۰۰۱ ۵۰٪ افزایش داشته است و تخمین زده می شود که این عدد تا سال ۲۰۳۰ از مرز ۳۶۶ میلیون نفر نیز گذر کند (۱۰).



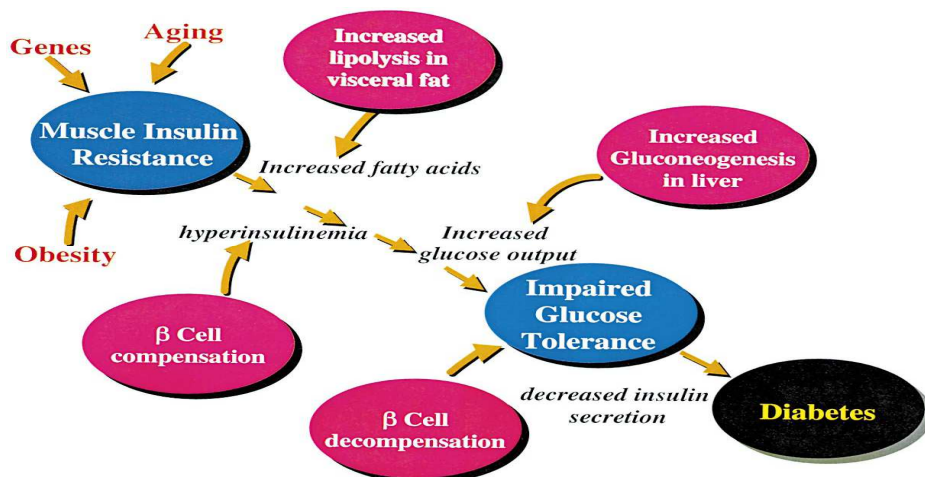
شکل ۳-۱: ارتباط میان چاقی و ابتلا به بیماری دیابت نوع دو

مهمترین اختلالی که در بروز دیابت نوع دو نقش دارد ایجاد مقاومت به انسولین (عدم پاسخ به میزان نرمال انسولین در گردش خون) و ترشح غیر طبیعی انسولین است (۹). تولید انسولین به جذب و مصرف و ذخیره گلوکز کمک کرده و باعث مهار تولید گلوکز کبدی و کاهش گلوکز پلاسما می گردد (۸). اهداف اصلی و اولیه انسولین، بافتهای عضله اسکلتی، چربی، کبد و قلب هستند. مقاومت به انسولین به دلیل نقص در پیام رسانی انسولین، تغییر در بیان پروتئین یا ژنهای هدف انسولین و یا نقص های متابولیکی دیگر و یا تقابل با هورمون

های دیگر رخ می دهد که به عنوان اصلی ترین عوامل ایجاد دیابت دو شناخته می شوند. جهش ژنتیکی در رسپتور انسولین به صورت بسیار نادری اتفاق می افتد (۸).

به نظر می رسد مقاومت به انسولین بر اختلال ترشح آن تقدم داشته و دیابت تنها زمانی حادث می شود که ترشح هورمون ناکافی باشد. در حالت نرمال به دنبال ایجاد مقاومت به انسولین، سلول های β پانکراس با ترشح انسولین بیشتر، سعی در جبران عارضه دارند اما اغلب قادر به ادامه این وضعیت نبوده و به وضعیت عدم تحمل گلوکز، هایپر گلیسمی مزمن و نهایتاً دیابت نوع دو ختم می شوند (۸،۷). پاتوژنز بیماری تحت تاثیر عوامل ژنتیکی، محیطی، چاقی، سن بالا و روش زندگی است (شکل ۴-۱).

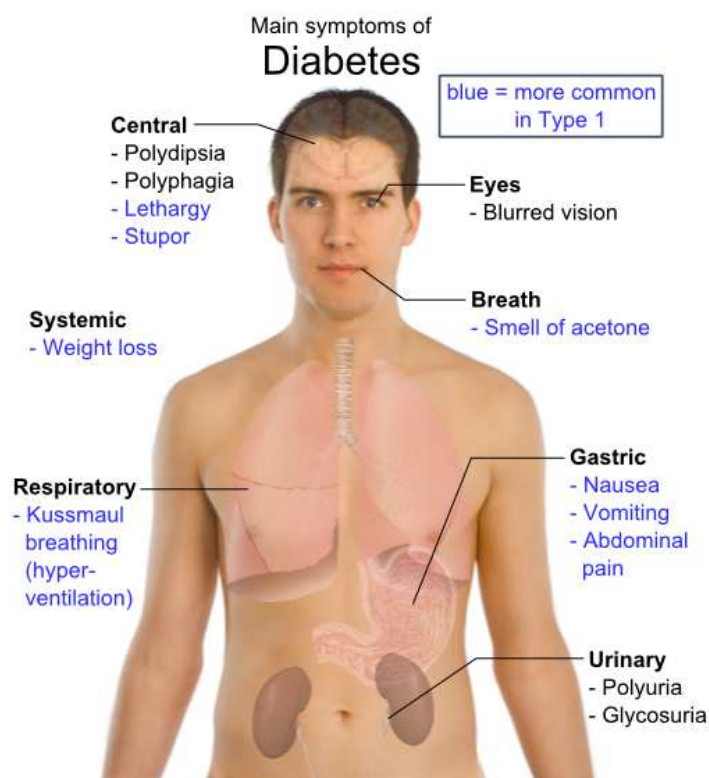
این بیماری پلی ژن و چند عامل بوده و بروز همزمان آن در دو قلو های هموزیگوت بین ۷۰ تا ۹۰٪ است (۱). وجود سابقه خانوادگی دیابت نوع دو شانس ابتلا به این بیماری را ۳ برابر افزایش می دهد (۱۱). شیوع بیماری در افراد بومی آمریکا بسیار بالا بوده و فرم اتوزومال غالب آن یا همان دیابت mody نیز با ترشح نامناسب انسولین به صورت جدی همراه بوده و فرم مادرزادی این بیماری نیز مد نظر می باشد (۱۲). چاقی، خصوصاً نوع احشایی و مرکزی در مبتلایان به دیابت نوع دو بسیار شایع بوده و لغت diabesity بیانگر این همراهی نزدیک است (شکل ۱-۳) (۱۱). چربی احشایی باعث از بین رفتن حساسیت بافتی به انسولین شده و ۱/۳ افراد چاق به دیابت نوع دو دچار می گردند (۷).



شکل ۴-۱: عوامل موثر بر ایجاد بیماری دیابت نوع دو

مشخصه دیابت پیشرونده، عملکرد و تنظیم نا مناسب بافت چربی و متابولیسم لیپید ها است که به عنوان فاکتور اصلی ایجاد مقاومت به انسولین ، به همراه عملکرد نامناسب سلولهای β ، به عنوان دو عارضه اصلی دیابت نوع دو شایان توجه هستند(شکل ۴-۱). نا گفته نماند آدیپوکاین های خاص منجمله IL-6 و $TNF\alpha$ نیز به دلیل دخالت مستقیم در جریان بروز مقاومت به انسولین، در پاتوژنز بیماری موثر هستند (۱۴).

عوارض مزمن این بیماری بسیاری از ارگانهای اصلی بدن را تحت تاثیر قرار داده و مسئول قسمت اعظم عوارض و مرگ و میر ناشی از این بیماری می باشد. عوارض عروقی شامل عوارض میکروواسکولار شامل رتینوپاتی، نفروپاتی و نوروپاتی(۵/موارد) و عارضه های ماکرو واسکولار(بیماری عروق کرونر قلب در مبتلایان به دیابت نوع دو ، ۲ تا ۴ برابر بیشتر از سایر افراد گزارش شده) و عوارض غیر عروقی نظیر عفونت ها و ناراحتی های گوارش و تغییرات پوستی، همه و همه تهدید کننده های جدی حیات فرد مبتلا به دیابت نوع دو قلمداد می گردند(شکل ۵-۱) (۱).

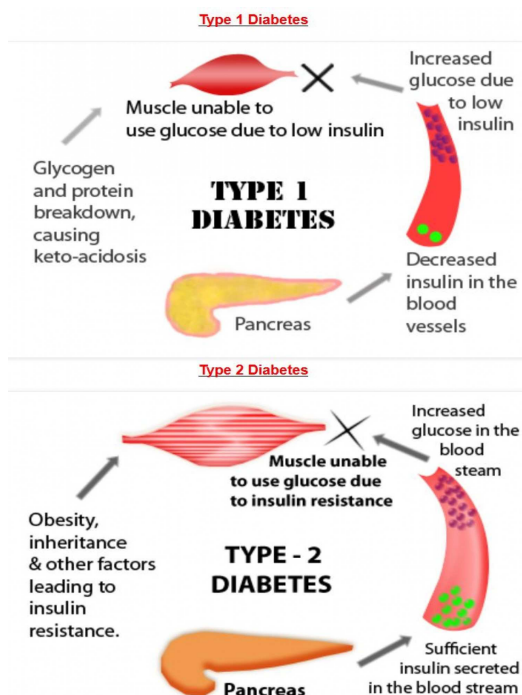


شکل ۱-۵- علائم و عوارض دیابت نوع دو

عارضه ها اغلب دو دهه بعد از هایپرگلیسمی رخ داده و از آنجایی که دیابت نوع دو اغلب یک دوره بدون علامت دارد، بسیاری از افراد مبتلا به بیماری در زمان تشخیص، به این عوارض دچار شده اند (۳) با این حال کاهش وزن و رعایت رژیم غذایی خاص می تواند به بهبود وضعیت بیمار کمک کند اما اکثراً این موارد کافی نبوده و سرانجام استفاده از سولفونیل اوره و نهایتاً درمان انسولینی اجتناب ناپذیر خواهد بود (۱۵).

۴-۱- تفاوت دیابت نوع یک و نوع دو

در دیابت نوع یک، سیستم ایمنی بدن به پانکراس (لوزالمعده) حمله کرده و پانکراس را تخریب می کند. در نتیجه بدن فاقد هورمون انسولین است، زیرا پانکراس این هورمون را تولید می کند. در دیابت نوع دو، معمولاً پانکراس به اندازه کافی انسولین تولید می کند، اما به دلایل متعدد، بدن به طور موثر از انسولین استفاده نمی کند. علائم این دو نوع دیابت شبیه یکدیگر می باشد، اما معمولاً این علائم در افراد مبتلا به دیابت نوع یک به سرعت ظاهر می شود (شکل ۶-۱).



شکل ۶-۱- تفاوت میان دیابت نوع یک و نوع دو

۱-۵- تشخیص دیابت

هدف از تشخیص، کنترل علائم بیماری دیابت و شناسایی افرادی است که در معرض خطر ابتلا به عوارض

میکرو و ماکروواسکولار دیابت قرار دارند آزمایش ادرار برای تشخیص قند، یکی از اولین آزمایش های بشر در علم پزشکی است که سابقه ای سه هزار ساله دارد. غلظت قند خون در افراد در معرض خطر ابتلا به عوارض مختلف متفاوت بوده و تعیین کننده ی روش درمان است.

مبتلایان به اختلال در تحمل گلوکز در معرض خطر بروز عوارض ماکرو و میکروواسکولار و پیشرفت به سوی دیابت هستند

تعریف سازمان بهداشت جهانی از دیابت (نوع یک و نوع دو) عبارتند از بالا رفتن گلوکز به همراه علائم، در غیر این صورت افزایش شاخص ها در دو صورت:

- گلوکز پلاسمای ناشتا $\geq 126 \text{ mmol/l}$
- با آزمایش تلورنس گلوکز، دو ساعت بعد از مصرف دوز خوراکی، گلوکز پلاسما $\geq 200 \text{ mmol}$

اندازه گیری تصادفی قند خون بیشتر از $(110,1 \text{ mg/dL})$ همراه با علائم رایج بیماری و روش دیگر تشخیص این بیماری هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) بیشتر از $6,5\%$ است (۱۶). در سال ۲۰۰۹ کمیته بین المللی کارشناسان که عبارتند بودند از نمایندگان انجمن دیابت آمریکا (ADA)، فدراسیون بین المللی دیابت (IDF)، و انجمن اروپایی ها در زمینه تحقیقات دیابت (EASD) پیشنهاد کردند که برای تشخیص دیابت از آستانه ای بین $6,5\% \leq \text{HbA1c}$ استفاده شود. این پیشنهاد در سال ۲۰۱۰ مورد پذیرش انجمن دیابت آمریکا قرار گرفت. آزمایش های مثبت باید تکرار شوند مگر آنکه نشانه های معمول بیماری و قند خون در فرد ظاهر شود (۱۷).

برای تشخیص دیابت این آستانه بر پایه رابطه میان نتایج تست تلورنس گلوکز، آزمایش قند ناشتا یا HbA1c و عوارضی از قبیل مشکلات مربوط به شبکه چشم می باشد (۱۶). آزمایش قند خون ناشتا یا تصادفی بر تست

تلورنس گلوکز ترجیح داده می‌شود چرا که انجام این آزمایش برای مردم راحت تر است. $HbA1c$ این مزیت‌ها را دارد که در آن نیازی به ناشتا بودن نیست و نتایج آن ثبات بیشتری دارد، اما عیب این آزمایش آن است که نسبت به اندازه گیری گلوکز خون هزینه بردارتر است (۱۶).

دیابت شیرین نوع دو با گلوکز بالای خون در شرایط مقاومت در برابر انسولین و کمبود نسبی انسولین مشخص می‌شود.^{۱۲} دیابت نوع یک و دو معمولاً بر اساس شرایط موجود شناسایی می‌شوند (۱۸). اگر در تشخیص تردیدی باشد می‌توان از آزمایش پادتن برای تایید دیابت نوع یک و از سطح پپتید C برای تایید دیابت نوع دو استفاده کرد (۱۹).

۱-۶-درمان دیابت نوع دو

در شروع بیماری می‌توان با افزایش ورزش و اصلاح رژیم غذایی دیابت نوع دو را کنترل کرد. اگر سطح گلوکز خون با این روش‌ها به اندازه کافی پایین نیاید، ممکن است مصرف داروهایی مانند متفورمین یا انسولین لازم باشد. معمولاً باید به طور مرتب سطح قند خون کسانی که انسولین مصرف می‌کنند کنترل شود.

۱-۶-۱-داروهایی که اختلال کارکرد سلول‌های بتا را هدف می‌گیرند

۱-۶-۱-۱-درمان‌های جدید مبتنی بر انسولین‌افزاها

داروهایی که پانکراس را هدف می‌گیرند، می‌توانند مستقیماً یا به طور غیرمستقیم روی سلول‌های بتا (که ترشح انسولین، پپتید C و آمیلین را بر عهده دارند)، سلول‌های آلفا (ترشح‌کننده گلوکاگون) یا سلول‌های دلتا (ترشح‌کننده سوماتواستاتین که به طور غالب باعث سرکوب ترشح گلوکاگون می‌شود)، اثر کنند (۲۰).

از اوایل قرن بیستم، شواهد بیانگر آن بوده است که عوامل روده‌ای در پاسخ به مواد مغذی ترشح می‌شوند تا کاهش گلوکز خون را تسریع کنند؛ این عوامل در سال‌های دهه ۱۹۳۰ تحت عنوان انسولین‌افزاها نامگذاری شدند. پاسخ بیشتر انسولین به گلوکز تجویز شده از راه دهان در مقایسه با گلوکز تجویز شده از راه وریدی حاصل اثر همین عوامل انسولین‌افزا است؛ این اثر انسولین‌افزاها احتمالاً سبب بیش از ۵۰٪ از ترشح مرتبط با

غذای انسولین در افراد سالم است. دو عامل انسولین‌افزای اصلی شامل پپتید انسولینوتروپیک وابسته به گلوکز (GIP) و GLP-1 هستند در مطالعات حیوانی (که البته در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ تأیید نشده است) 1- GLP باعث افزایش توده سلول‌های بتا و کاهش آپوپتوز آنها از طریق افزایش بیان چندین ژن کلیدی مسئول در تمایز سلول‌های بتا می‌شود. نتایج مطالعات در حیوانات همچنین نشان می‌دهد که GLP-1 می‌تواند به طور مستقل باعث پیشبرد تجمع گلیکوژن در کبد، افزایش جذب گلوکز و کاهش غلظت تری‌گلیسیریدها شود (۲۰)..

۱-۶-۲- محرک‌های غیر انسولین‌افزای سلول‌های بتا

فسفریلاسیون گلوکز توسط گلوکوکیناز بعد از ورود به سلول‌های بتا، سرعت متابولیسم گلوکز و تولید ATP متعاقب آن را که باعث بسته شدن کانال‌های پتاسیم-ATP و شروع ترشح انسولین می‌شود، تحت تأثیر قرار می‌دهد. جهت افزایش عمل گلوکوکیناز در سلول‌های بتا، چندین فعال‌کننده گلوکوکیناز نظیر پیراگلیاتین و غیره تولید شده است. فعال‌کننده‌های گلوکوکیناز سبب افزایش غلظت انسولین و کاهش غلظت گلوکز در مدل‌های حیوانی دیابت و بیماران دچار دیابت نوع دو شده‌اند. فعال‌کننده‌های گلوکوکیناز، می‌توانند از طریق اثر بر متابولیسم کبدی گلوکز هم، باعث کاهش بیشتر غلظت گلوکز شوند. فعال سازی گلوکوکیناز با افزایش غلظت تری‌گلیسیریدها و خطر هیپوگلیسمی همراه است (۲۰)..

۱-۶-۲- داروهایی که اختلال کارکرد سلول‌های آلفا را هدف می‌گیرند

بیماران مبتلا به دیابت نوع دو معمولاً غلظت گلوکاگون ناشتای بسیار بالا و اختلال سرکوب ترشح بعد از غذای گلوکاگون دارند (یعنی نسبت انسولین به گلوکاگون پایین). گلوکاگون، ساخت گلیکوژن کبدی را سرکوب و گلیکوژنولیز و گلوکونئوژنز را تحریک می‌کند. بنابراین گلوکاگون بیش از اندازه، از مهار طبیعی برون‌ده گلوکز کبدی جلوگیری می‌کند و در هیپرگلیسمی ناشتا و بعد از غذا در دیابت نوع دو دخیل است. درمان‌های مبتنی بر انسولین‌افزاها (آگونیست‌های GLP-1 و مهارکننده‌های DPP-4) به شیوه‌ای وابسته به گلوکز، ترشح گلوکاگون را کاهش می‌دهند (یعنی تنها در ارتباط با هیپرگلیسمی) و بدون اختلال در تنظیم متقابل هیپوگلیسمیک، سبب کاهش غلظت گلوکز بعد از غذا می‌شوند (۲۰)..

۱-۶-۳- افزایش دهنده‌های عملکرد انسولین

بسیاری از بیماران دچار دیابت نوع دو به تلفیقی از دو یا تعداد بیشتری از داروهای با عملکردهای مختلف کاهنده قند خون نیاز دارند. انسولین برای جبران نارسایی پیشرفته سلول‌های بتا به کار می‌رود و ممکن است برای غلبه بر مقاومت شدید به انسولین نیز به کار گرفته شود. در سال ۱۹۹۹ یک متابولیت غیرپپتیدی (دمتیل استریکینون، L-۷۸۳۲۸۱) در کشت‌های قارچی موسوم به سودوماساریا شناسایی شد که تیروزین‌کیناز گیرنده انسولین انسانی را فعال می‌نمود (۲۰). این مولکول هنگامی که به صورت خوراکی تجویز می‌شد، غلظت قند خون را در مدل‌های جوندگان دیابتی کاهش می‌داد. عملکرد انسولین را می‌توان با طولانی‌تر کردن فسفریلاسیون زیرواحد بتای گیرنده انسولین بعد از اتصال انسولین به زیرواحد آلفا نیز تقویت کرد. دسته‌های مختلفی از ترکیبات نظیر TLK16998 و واسطه‌های سیگنال‌دهی که توسط پپتید C و عامل رشد شبه انسولینی-۱ فعال می‌شوند، می‌توانند عملکرد انسولین را تقویت کنند. TLK16998 یک ملکول غیرپپتیدی است که انسولین را از گیرنده‌اش جدا نمی‌کند و اثری در غیاب انسولین ندارد ولی در حضور انسولین، فسفریلاسیون زیرواحد بتا را افزایش می‌دهد. مهارکننده‌های پروتئین تیروزین فسفاتاز B۱، دفسفریلاسیون زیرواحد بتا را کاهش می‌دهند و به این ترتیب عملکرد انسولین را تقویت می‌کنند. این مهارکننده‌ها، غلظت گلوکز را در یک مدل حیوانی هیپرگلیسمی کاهش می‌دهند و ممکن است به کاهش وزن کمک کنند و کارکرد اندوتلیال را بهبود بخشند. نمک‌های وانادیوم نیز فعالیت فسفاتاز را کاهش می‌دهند و اثرات انسولین را به اندازه کافی تقویت می‌کنند تا کنترل قند در مدل‌های حیوانی دیابت بهبود یابد، اگر چه محدوده درمانی این ماده باریک است. درمان می‌تواند به صورت منقطع و طولانی‌مدت انجام شود و دورنمای استفاده از ترکیبات ارگانیک وانادیوم به عنوان تقویت کننده‌های انسولین، غیرواقع‌گرایانه نیست (۲۰).

۱-۶-۴- داروهایی که مسیرهای غیروابسته به انسولین را هدف می‌گیرند.

۱-۶-۴-۱- مهارکننده‌های انتقال دهنده همزمان سدیم- گلوکز (SGLT2)

در دیابت نوع دو، گلوکونئوژنز کلیوی افزایش می‌یابد و ممکن است بازجذب گلوکز کلیوی به دلیل تنظیم افزایشی ناقل SGLT2، افزایش پیدا کند. اگر چه در دیابت نوع دو، هیپرگلیسمی غالباً از آستانه کلیوی فراتر

می‌رود، مهار SGLT2 می‌تواند گلوکوزوری را در حدی افزایش دهد که سبب کاهش هیپرگلیسمی شود. از آنجا که مهار SGLT2 وابسته به انسولین است و در غلظت‌های پایین گلوکز توسط بازجذب گلوکز از طریق SGLT1 جبران می‌شود، خطر بروز هیپوگلیسمی پایین است (۲۰). همچنین اثر گلوکوزوریک آن می‌تواند به کاهش وزن کمک کند و شاید از طریق دیورز اسموتیک خفیف به کاهش فشار خون هم کمک کند. چندین مهارکننده SGLT2 از جمله داپاگلیفلوزین (dapagliflozin) و کاناگلیفلوزین (Canagliflozin) در دست تولید هستند. داپاگلیفلوزین غلظت‌های HbA1C و گلوکز پلاسمای ناشتا و بعد از غذا و وزن بدن را با خطر ناچیز هیپوگلیسمی، کاهش می‌دهد. این دارو را می‌توان به تنهایی یا توام با داروهایی مثل انسولین مصرف کرد. اثر این دارو بر کاهش وزن در بیمارانی که طول مدت دیابت آنها طولانی‌تر بوده، چشمگیرتر است (۲۰).

۱-۶-۴-۲- اهداف کبدی

کبد با پاکسازی سریع گلوکز بعد از غذا از ورید پورت به هومئوستاز گلوکز کمک می‌کند؛ هنگامی که گلوکز خون به کمتر از غلظت طبیعی برسد، گلیکوژن آزاد و گلوکز توسط گلوکونئوژنز تولید می‌شود. گلوکز ۶- فسفاتاز، در مرحله نهایی گلیکوژنولیز و گلوکونئوژنز، گلوکز ۶- فسفات را به گلوکز تبدیل می‌کند. از این رو، مهار این آنزیم، برون‌ده گلوکز کبدی را کاهش می‌دهد و غلظت گلوکز را پایین می‌آورد. درمان‌های رایج مورد استفاده برای دیابت نظیر مت‌فورمین و انسولین، می‌توانند بیان گلوکز ۶- فسفاتاز را کاهش دهند (۲۰).

۱-۶-۵- داروهایی که نشانگان متابولیک را هدف می‌گیرند

۱-۶-۵-۱- آنتاگونیست‌های GIP

GIP همانند GLP-1 ترشح وابسته به گلوکز انسولین را تقویت می‌کند، اما برخلاف GLP-1، رسوب چربی در سلولهای چربی را تشدید می‌کند، ترشح گلوکاگون را مهار نمی‌کند و اثر کمی بر دریافت غذا، سیری، تخلیه معده یا وزن بدن دارد.

مطالعات روی مدل‌های حیوانی دیابت نشان داده است که مهار عملکرد GIP سبب افزایش مصرف انرژی و کاهش رسوب چربی و سمیت چربی می‌شود. این مهار اثر مطلوبی بر هومئوستاز گلوکز دارد، جذب گلوکز عضلانی را افزایش می‌دهد، برون‌ده گلوکز کبدی را می‌کاهد و کارکرد سلول‌های بتا را بهبود می‌بخشد. بنابراین آنتاگونیست‌های گیرنده GIP، درمان‌های بالقوه‌ای برای بیماران مبتلا به دیابت نوع دو به شمار می‌روند (۲۰)..

۱-۶-۵-۲- تعدیل کننده‌های PPAR

گیرنده‌های فعال پراکسی‌زوم- تکثیرکننده- فعال شده^(۱) (PPARs) با گیرنده رتینوئید- X هترودیمرهایی را تشکیل می‌دهند که ترجمه طیف وسیعی از ژن‌های موثر بر متابولیسم مواد مغذی و التهاب را تعدیل می‌کنند. آگونیست‌های PPAR- γ (مانند پیوگلیتازون)، حساسیت به انسولین را بهبود می‌بخشند و درمان اثبات‌شده‌ای برای دیابت نوع دو هستند (۲۰)..

۱-۶-۶-۶- داروهای با مکانیسم‌های ناشناخته

۱-۶-۶-۱- آگونیست‌های گیرنده D2 دوپامین

بروموکریپتین یک آلکالوئید ارگوت و آگونیست گیرنده D2 دوپامین است. اگر چه بروموکریپتین سریع‌رهش تنها از سال ۲۰۱۰ توسط اداره نظارت بر دارو و غذای ایالات متحده (FDA) برای درمان دیابت نوع ۲ به عنوان مکملی برای اصلاح شیوه زندگی مورد تایید قرار گرفته است، اما اثرات آن بر متغیرهای مربوط به گلوکز از سال ۱۹۸۰ مشاهده شده بود. بروموکریپتین اثرات خود را بدون افزایش غلظت انسولین و احتمالاً توسط تغییر فعالیت نورون‌های هیپوتالاموسی در جهت کاهش گلوکونئوز کبدی از طریق مسیری با واسطه واگ اعمال می‌کند. بروموکریپتین در اروپا برای درمان دیابت نوع دو مجوز نگرفته است (۲۰)..

۱-۶-۶-۲- جداکننده‌های اسیدهای صفراوی

نقش جداکننده‌های اسیدهای صفراوی برای درمان دیس‌لیپیدمی به خوبی اثبات شده است و این داروها بیماری‌های قلبی- عروقی را کاهش می‌دهند. این داروها غلظت گلوکز را نیز در بیماران دچار دیابت نوع ۲

کاهش می‌دهند. مکانیسم عمل این داروها معلوم نیست ولی احتمالاً با واسطه فعال‌سازی گیرنده‌های فارنزوئید کبدی است (۲۰) ..

۱-۶-۷- جراحی

جراحی برای کاهش وزن در افراد چاق روش موثری برای درمان دیابت است (۲۱). بعد از جراحی افراد زیادی هستند که می‌توانند با دارو یا بدون آن سطح قند خون خود را در وضعیت طبیعی نگهدارند و در دراز مدت میزان مرگ و میر کاهش می‌یابد. البته خطر مرگ و میر بر اثر جراحی نیز وجود دارد که میزان آن کمتر از ۱٪ است (۲۲). مقاطع مناسب شاخص میزان وزن سالم برای انجام جراحی هنوز مشخص نیست. البته توصیه می‌شود که این مسئله در مورد کسانی که قادر نیستند تا وزن و قند خون را کنترل کنند در نظر گرفته شود (۲۳).

۱-۷-۷- مکانیسم مولکولی آغاز کننده بیماری دیابت نوع دو

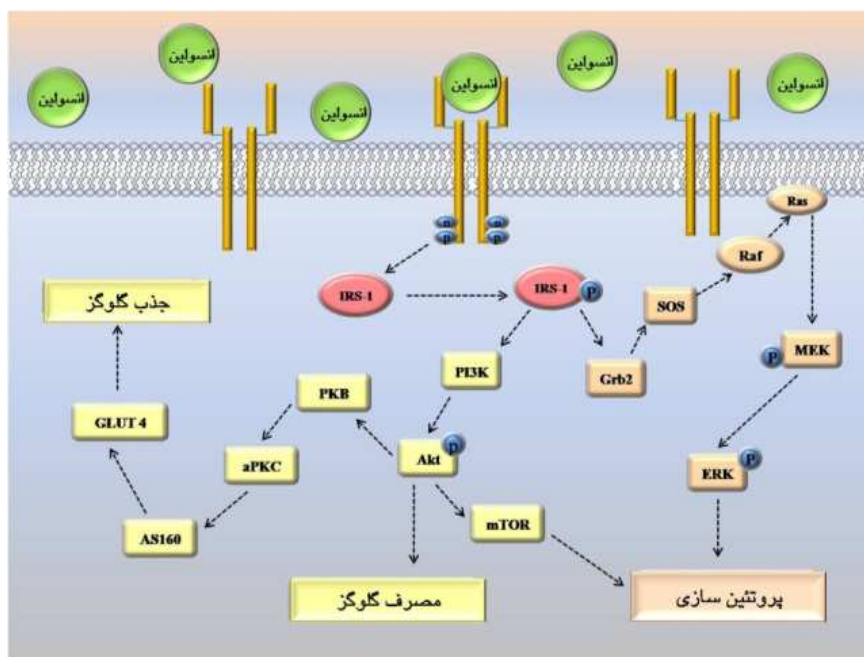
۱-۷-۱- مقاومت به انسولین اولین مرحله ایجاد بیماری

مهم‌ترین اختلالی که در بروز دیابت نوع دو نقش دارد ایجاد مقاومت به انسولین (عدم پاسخ به میزان نرمال انسولین در گردش خون) و ترشح غیر طبیعی انسولین است (۱۴) .. مقاومت به انسولین به دلیل نقص در پیام رسانی انسولین، تغییر در بیان پروتئین یا ژن‌های هدف انسولین، نقص‌های متابولیکی دیگر و یا تقابل با سایر هورمون‌های دیگر رخ می‌دهد که به عنوان اصلی‌ترین عوامل ایجاد دیابت دو شناخته می‌شود (۲۴). تاکنون یک یا دو ژن اصلی و تعداد زیادی ژن فرعی در پاتوژنز دیابت ۲ دخیل شناخته شده‌اند اما ارتباط کامل آن‌ها هنوز شناسایی نشده است. ژن‌های دخیل در پیام رسانی انسولین، انتقال گلوکز، سنتز گلیکوژن، جذب و سنتز اسید چرب، و تمایز سلولهای چربی از جمله کاندیداهای ژنی صلاحیت‌دار به شمار می‌روند (شکل ۱-۴) (۲۵). با این حال جزئیات دقیق مکانیسم مولکولی رخداد مقاومت به انسولین در پرده‌ایی از ابهام قرار دارد.

۱-۷-۱-۱- مکانیسم های مولکولی ایجاد مقاومت به انسولین

۱-۷-۱-۱-۱-اختلال در نقل و انتقال مولکول GLUT4^۲

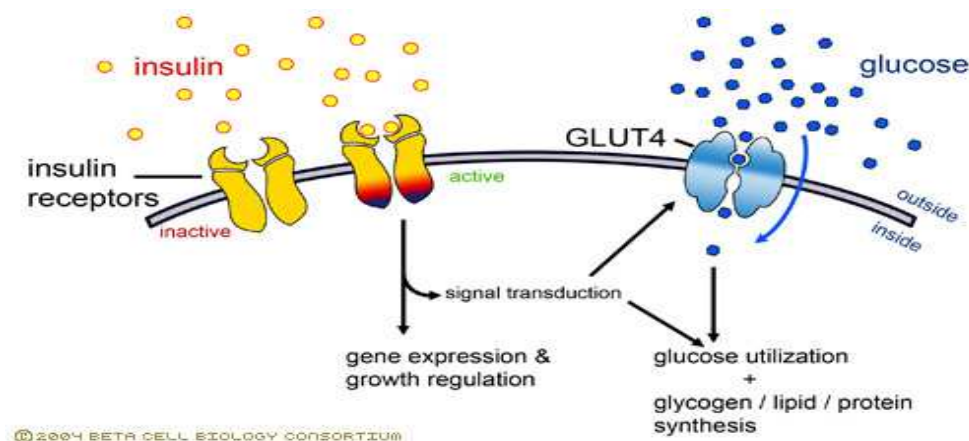
انسولین سه بافت اصلی هدف را نشانه گیری می کند: عضلات اسکلتی، بافت چربی و کبد. شکل ۷-۱ مسیر پیام رسانی درون سلولی هورمون انسولین را در بافت هدف نمایش می دهد.



شکل ۷-۱: مسیر پیام رسانی هورمون انسولین در بافت های هدف

به دنبال اتصال هورمون انسولین به رسپتور اختصاصی جذب گلوکز در سلول های هدف هورمون، توسط ناقل قندی GLUT4 صورت می پذیرد. در سلول تحریک نشده با هورمون، مولکول های GLUT4 درون وزیکول های خاصی در محیط سیتوپلاسم محصور بوده و دائماً به صورت اندوزومی میان سطح ترانس گلژی و عوامل توبولو وزیکولار در رفت و آمد هستند (شکل ۸-۱) (۲۶).

² Glucose transporter type 4



شکل ۱-۸- جذب قند موجود در خون توسط ناقلین GLUT4 در پاسخ به ترشح هورمون انسولین

به دنبال ترشح انسولین وزیکول های حاوی ذخایر GLUT4 به صورت فیزیکی به سطح غشا پلاسمایی سلول منتقل و متصل می شوند تا به جذب بیشتر گلوکز توسط سلول کمک کنند. انسولین با فعال کردن فسفو اینوزیتید ۳- کیناز کلاس I (PI3K) ، PIP_2^3 را به PIP_3^4 تبدیل کرده و واسطه های سیتوزولی دیگری نظیر $AS160^5$ ، AKT^6 ، $PDK1^5$ و پروتئین کیناز های C اتیپیکال را فعال می نماید (۲۶). بروز تغییر در میزان بیان یا ترکیب شیمیایی هر کدام از مولکولهای شرکت کننده در این مسیر می تواند در بروز بیماری دخیل باشد. فسفوریله شدن $AS160$ باعث افزایش انتقال GLUT4 به سطح سلولی می شود در حالیکه در عضله افراد دیابتی میزان فسفوریله شده آن کاهش یافته است (۲۷). با بررسی میزان بیان GLUT4 در افراد مبتلا به دیابت دو مشاهده شده است که بیان پروتئین در سطح نرمال وجود دارد اما میزان انتقال آن به سطح سلول کاهش یافته است (۲۸). در بسیاری از سلولها نظیر سلولهای عضلات اسکلتی در حالت نرمال فعالیت PI3K ، به فعال شدن فاکتور تعویض نوکلئوتید گوانین GEF برای $Rac1$ (GTPase) های کوچک خانواده Rho می انجامد که در متحرک کردن اکتین اسکلت سلولی و تسهیل حمل و نقل GLUT4 دخالت دارد. از سوی دیگر وزیکول های حاوی GLUT4 با PIP_3 و پروتئین ۲ غشایی همراه وزیکول یا $VAMP2^8$ همراه

³ Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate

⁴ Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate

⁵ Phosphoinositide-dependent

⁶ Protein kinase B

⁷ Rab-GTPase activating protein

⁸ Vesicle-associated membrane protein 2

هستند تا فرایند انتقال و اتصال به سطح سلول را به انجام رسانند (۲۹،۳۰). نقص در این دو پروتئین می تواند انتقال GLUT4 به سطح سلول و جذب گلوکز را تحت تاثیر قرار داده و نهایتاً عملکرد هورمون انسولین را مختل کند. وجود Rac1 در سلول عضلانی برای این انتقال ضروری است. عضلاتی که فاقد بیان Rac1 باشند قادر به دوباره باز آرایشی اکتین اسکلت سلولی نبوده و در نتیجه انتقال GLUT4 وابسته به ترشح انسولین به سطح سلول متوقف می شود (۲۶). اما مسیر اگزوسیتوز اکتینی GLUT4 تحریک شده از طریق انسولین، در سلولهای چربی متفاوت است. در بافت چربی، پروتئین های ^۹TC10، ^{۱۰}N-WASP و فودرین به جای ^{۱۱}Rac1 در نقل و انتقال GLUT4 از طریق اکتین اسکلت سلولی شرکت دارند. پس دور از ذهن نیست که نقص در هر یک اجزا شرکت کننده در مسیر حمل ناقلین گلوکز به سطح سلول بتواند سرآغاز فرایند ایجاد مقاومت به انسولین در بافت هدف هورمون به شمار آید.

۱-۷-۱-۱-۲- چاقی و چربی های احشایی:

چاقی، خصوصاً نوع احشایی و مرکزی در مبتلایان به دیابت نوع دو بسیار شایع بوده (۱۳) و ۱/۳ افراد چاق به دیابت نوع دو دچار می گردند (۴). تجمع بافت چربی خصوصاً در ناحیه شکمی و عدم تعادل در جذب انرژی و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب نقش مستقیمی را در ایجاد حالت مقاومت به انسولین بازی می کند (۳۱).

۱-۷-۱-۱-۳- چربی، تغذیه و فعال شدن مسیر mTOR^{۱۲}

مشخصه دیابت پیشرونده، عملکرد و تنظیم نامناسب بافت چربی و متابولیسم لیپید هاست که به عنوان یکی از فاکتورهای اصلی ایجاد مقاومت به انسولین به همراه عملکرد نامناسب سلولهای بتای پانکراس به عنوان دو عارضه اساسی دیابت نوع دو شایان توجه هستند (۳۲).

^۹ Small signaling G protein

^{۱۰} Neural wiskott-aldrich syndrome protein

^{۱۱} Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

^{۱۲} Mamalian target of rapamycin

مطالعات اخیر نشان می دهند فعال شدن مسیر پروتئین کینازی mTOR - که مسیر هماهنگ کننده پیام های تغذیه ایی و هورمونی است- می تواند به ایجاد مقاومت به انسولین ختم شود (شکل ۹-۱). mTOR مانند یک لوپ فیدبکی با فسفوریله کردن سرین های موجود روی اولین سوبسترای انسولین یا IRS-1^{۱۳} مانع فعال سازی PI3K و AKT از طریق IRS-1 شده و این دو مولکول اجرایی فعالیت متابولیکی هورمون انسولین را غیر فعال می کند (۳۳). این لوپ فیدبکی در سلول های عضلانی و چربی و کبدی دیده شده است (۳۴-۳۵) و در بافت کبد و عضله رت هم به اثبات رسیده است (۳۴). به نظر می رسد مسیر mTOR و عضو اجرایی آن یا S6K1^{۱۴} در حیوانات مدلی که به صورت ژنتیکی و یا از طریق رژیم غذایی به چاقی مرتبط با مقاومت به انسولین مبتلا شده اند به صورت بالایی بیان می شود. (شکل ۹-۱) اسید آمینه سرین موقعیت ۱۱۰۱ در مولکول IRS-1 به عنوان هدف مولکولی S6K1 در کبد حیوانات چاق و عضله انسانها شناخته شده است و، می تواند در آینده به عنوان ابزار های تشخیصی و درمانی این بیماری مورد توجه قرار گیرد (۲۶). اسیدهای چرب آزاد می توانند با تغییر در میزان بیان رسپتور انسولین و یا اتصال هورمون به آن و تاثیر بر فعالیت تیروزین کینازی رسپتور، به ایجاد حالت مقاومت به انسولین کمک کنند. افزایش چربی آزاد با بکار گیری پروتئین کیناز C اپسیلون و همکاری فاکتور رونویسی HMGA^{۱۵} باعث محدودیت در عملکرد SP1^{۱۶} و CEBP^{۱۷} روی پروموتور ژن رسپتور انسولین شده و نهایتا با تغییر بیان رسپتور انسولین و کاهش حضور آن در سطح سلول، حالت مقاومت به هورمون را پدید آورد. از سوی دیگر مصرف چربی اشباع شده فعالیت AKT- PKC وابسته به انسولین را متوقف کرده و باعث افزایش میزان سرامید و دی اسیل گلیسرول در کشت سلولهای عضلانی می شود (۳۷). مطالعات نشان می دهد که به دلیل مصرف بالای مواد پرچرب، الدئید های فعال عضله اسکلتی مانند ۴- هیدروکسی نونال (HNE) - که به عنوان بیومارکر پراکسیداسیون چربی معرفی شده اند - با تجمع چربی در سلولهای عضلانی در افراد کم تحرک همراه می شود که در حالت مقاومت به انسولین و بیماران دیابتی این میزان، افزایش یافته و رابطه معنی داری را نشان می دهد (۳۸،۳۹).

¹³ Insulin receptor substrate 1

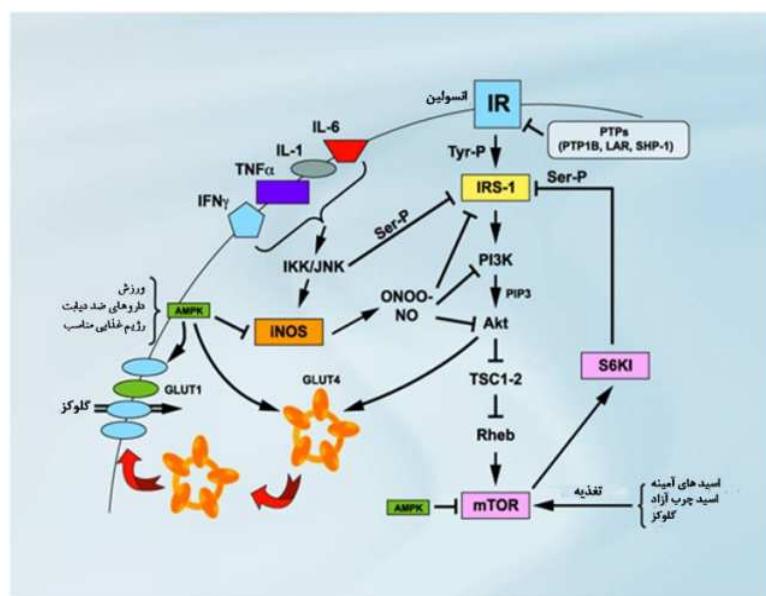
¹⁴ Ribosomal protein S6 kinase beta 1

¹⁵ High mobilitygroup protein with AT-hook

¹⁶ Specificity protein 1

¹⁷ CCAAT enhancer-binding protein

میزان بالای اسید چرب آزاد می تواند به کاهش عملکرد هگژو کیناز II و گلوکز ۶ فسفاتاز عضلانی نیز منجر شده (۴۰،۴۱) و به نوبه خود مقاومت به هورمون انسولین را در کبد و یا سراسر بدن ایجاد کند (۲۸).



شکل ۹-۱ : واسطه های مولکولی دخیل در ایجاد فرایند مقاومت به انسولین در بافت هدف و مسیر مهار کننده بیماری

۱-۷-۱-۴- پروتئین کیناز C اتیپیکال (aPKC)

به نظر می رسد میان این دسته از آنزیمها و مقاومت به انسولین القا شده توسط اسید چرب آزاد ارتباط خاصی وجود داشته باشد مصرف چربی در رت و انسان باعث جذب نا مناسب گلوکز وابسته به انسولین در عضله و فعالیت هم زمان پروتئین کیناز C تتا و پروتئین کیناز C گاما- که به همراه پروتئین کیناز C دلتا ایزوفرم های اتیپیکال هستند- می گردد (۳۳). پروتئین کیناز C دلتا یکی از اهداف فسفوریلاسیون رسپتور انسولین در موقعیت سرین است و افزایش آن فسفوریلاسیون تیروزین رسپتور انسولین- آغاز کننده مسیر پیام رسانی هورمون- را کاهش داده و میزان اثر بخشی هورمون انسولین را تغییر می دهد (۳۳).

۱-۷-۱-۵-آدیپوکاین ها: سیتوکین های مترشحه از بافت چربی

آدیپوکاین های خاص منجمله IL-6 و TNF α نیز به دلیل دخالت در جریان بروز مقاومت به انسولین، در پاتوژنز بیماری موثر هستند (۱۴). این مولکول ها با راه اندازی مسیر های پیام رسانی خود به فعالیت مولکولهای نظیر JNK^{۱۸} و IKK^{۱۹} مبادرت می کنند. JNK و IKK می توانند با افزایش فرایند فسفوریلاسیون سرین IRS-1 و یا از طریق افزایش رونویسی از ژنهای التهابی نظیر iNOS به ایجاد حالت مقاومت به انسولین بپردازد. فعالیت iNOS میزان تولید NO و مشتقات فعال پیروکسی نیتريت را بالا می برد. NO و پیروکسی نیتريت باعث مختل شدن مسیر پیام رسانی انسولین از طریق نیترا ته کردن و یا نیتروزیلاسیون IRS-1, PI3K و AKT می شوند که مولکولهای کلیدی انتقال GLUT4 به سطح سلول و نهایتا جذب قند توسط میوسیتها هستند (شکل ۹-۱). البته در مورد نقش IL-6 و TNF α شبهاتی نیز وجود دارد.

۱-۷-۱-۶- Rho کیناز (ROCK)^{۲۰}

Rho کیناز ها سرین / پروتئین کیناز هایی وابسته به GTP هستند که در دسته همولوگ های وابسته به Ras طبقه بندی می شوند. ارتباط نزدیکی میان Rho کیناز و IRS-1 وجود داشته ، به نحوی که کاهش آن به کاهش میزان IRS-1 و در نهایت کاهش فعالیت PI3K در بافت چربی و عضله منجر می شود. با حذف ژن ROCK در موش حالت مقاومت به انسولین سراسری در کل بدن حیوان به دلیل اختلال در فسفوریله شدن تیروزین IRS-1 ایجاد می شود (۲۶).

۱-۷-۱-۷- فسفاتاز های پروتئین فسفاتاز و لیپید فسفاتاز

فسفوریله شدن تیروزین کلید اصلی راه اندازی مسیر پیام رسانی انسولین محسوب می شود ، بنابراین پروتئین فسفاتاز ها به عنوان مهم ترین مهار کننده های این مسیر به شمار می آیند. در بررسی های گذشته به نقش

¹⁸ C-Jun Nterminal kinase

¹⁹ I κ B kinase

²⁰ Rho-associated protein kinase

فسفاتاز های $PTP1B^{21}$ و LAR^{22} در مهار فعالیت کینازی رسپتور انسولین در کبد و بافت های محیطی هدف هورمون انسولین اشاره شده است (۴۲،۴۳). LAR و $PTP1B$ در کبد افراد دیابتی تا سه برابر افزایش یافته و در بافت عضله و چربی نیز بیان بالایی دارد. اما به نظر می رسد تنها در کبد و عضله می تواند حالت مقاومت به انسولین را ایجاد کند (۲۶). اخیرا گزارشاتی مبنی بر نقش فسفاتاز $SHIP^{23}$ به عنوان مهار کننده جدید مسیر پیام رسانی هورمون در کبد و عضله اسکلتی به چاپ رسیده است. موش های مدل فاقد $SHIP$ دارای مقاومت به قند و حساسیت به انسولین قابل ملاحظه ایی بوده اند که به افزایش عملکرد پیام رسانی انسولین از مسیر $IRS-PI3K-AKT$ در کبد و عضله منجر می شود (شکل ۱-۹). به نظر می رسد $SHIP$ با مهار تولید $PIP3$ فعالیت مهاری خود را انجام می دهد. فسفولیپاز لیپیدی $PTEN^{24}$ نیز انتاگونیست $PI3K$ بوده و از این مسیر به مهار فعالیت پیام رسانی هورمون می پردازد (۴۰).

۸-۱. زیست شناسی microRNA ها

$miRNA$ ها دسته ایی از RNA های تنظیمی با طول کوتاه هستند که در تعداد زیادی از یوکاریوت ها اعم از تک سلولی و پرسلولی ایفای نقش می کنند (۴۴). تاکنون بیش از ۶۰۰۰ $miRNA$ ویروسی گیاهی و حیوانی در بانک اطلاعاتی سنکر (<http://mirbase.org>) ثبت شده است.

در سال ۱۹۹۳ اولین $microRNA$ به نام $lin-4$ کشف شد. هفت سال بعد دومین $microRNA$ به نام $let-7$ شناخته شد و شناسایی این RNA ها ادامه پیدا کرد به طوری که هم اکنون می دانیم بسیاری از ارگانیسم های پرسلولی صدها نوع از $microRNA$ ها را بیان می کنند که توزیع آن ها در سلول ها و بافت های مختلف متفاوت است (۴۵).

²¹ Protein-tyrosin-phosphatase 1B

²² Leukocyte antigen-related protein

²³ Inositol polyphosphate-5 phosphatase with SH2 domain

²⁴ Phosphatase and tensin homologue

طبق تعریف، miRNA به RNAهای کوچکی گفته می شود که از پیش سازی با ساختار stem-loop منشأ گرفته اند و با هدف قرار دادن mRNAها و برش دادن آنها و یا با مهار بیان ژن های آنها به صورت کلیدی در تنظیم ژن ها دخالت می کنند (۴۶، ۴۷).

با در نظر گرفتن ساختمان دورشته ای و سنجاق سری^{۲۵}، miRNA و siRNA به نظر می رسد که ارتباط خویشاوندی و شباهت زیادی به یکدیگر دارند (۴۸).

siRNA را می توان به عنوان یک فرم دورشته ای miRNA در نظر گرفت که هم رشته مکمل و هم رشته مقابل^{۲۶} را شامل می شود. بنابراین ممکن است siRNA را به عنوان نوعی پیش ساز miRNA نیز در نظر گرفت.

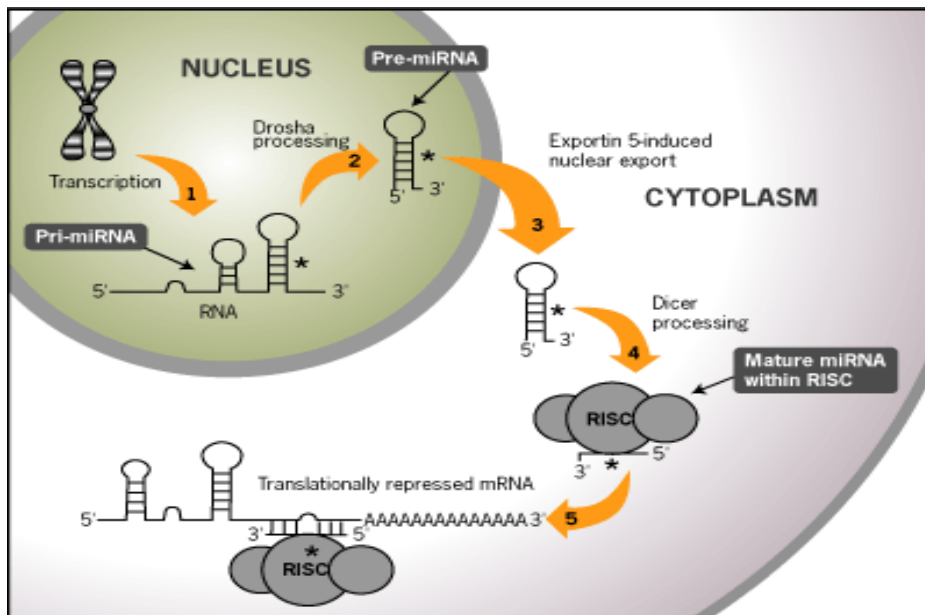
miRNAs ها بیان ژن را از طریق اتصال به 3'-UTR موجود در یک یا چند mRNA هدف مختلف، سرکوب می کنند. اتصال miRNA به mRNA هدف موجب جلوگیری و مهار فرآیند ترجمه می شود. در بعضی موارد به نظر می رسد که شکل گیری RNA دو رشته ای به دنبال اتصال miRNA به mRNA هدف موجب تجزیه mRNA هدف از طریق فرآیندی مشابه RNAi می گردد، اگرچه که در مواردی دیگر مهار بیان ژن از طریق توقف ترجمه (به دلیل اتصال miRNA به mRNA هدف) و بدون تجزیه mRNA هدف انجام می گیرد (۴۹).

به دلیل اینکه عملکرد مهار بیان ژن توسط miRNA براساس اتصال miRNA به mRNA هدف صورت می گیرد و در این اتصال miRNA به طور کامل مکمل mRNA هدف نمی باشد و همواره جفت شدن با اشتباه^{۲۷} وجود دارد، بنابراین قابل پیش بینی است که یک miRNA چندین mRNA هدف داشته باشد و همچنین اتصال چندین miRNA به یک mRNA نیز محتمل است که در مجموع این تعاملات بیان ژن های هدف را در بافت ها و سلول های مختلف با شدت های گوناگون تنظیم می کنند. بنابراین miRNAs می توانند نقش بسیار گسترده ای در تنظیم بیان ژن داشته باشند و در واقع کشف این ملکول ها باعث بروز انقلابی در دانسته های ما در رابطه با تنظیم بیان ژن در سطوح پایین تر از DNA شده است (۵۰، ۴۸). شکل (۱-۱۰).

²⁵Hair pin

²⁶Reverse

²⁷Miss match pairing



شکل ۱-۱۰. بیوسنتز و مکانیزم عمل میکرو RNA

۱-۸-۱- بیوسنتز و مکانیزم عمل میکرو RNA

miRNA های بالغ طولی بین 18-26 نوکلئوتید دارند. پیش‌ساز آن‌ها که pre-miRNA نامیده می‌شود ساختاری stem-loop با طولی مابین 60-80 نوکلئوتید دارد. این pre-miRNA از نسخه RNA بلندی که pri-miRNA نامیده می‌شود منشا می‌گیرد. pri-miRNA می‌تواند تا 1 kbp یا بیشتر طول داشته باشد (۵۲، ۵۱). بیشتر pri-miRNA ها نسخه‌های RNA مستقلی، با پروموتور منحصر به خود می‌باشند و با RNA polymerase III رونویسی می‌گردند. این در حالی است که گروه دیگری از miRNA های پستانداران در داخل بخش اینترون mRNA های دیگر قرار دارند و pri-miRNA آن‌ها در واقع همان mRNA پروتئینی است که ژن آن حاوی توالی miRNA است (۵۳).

pri-miRNA ابتدا در هسته توسط یک کمپلکس ریزپردازشگر نوکلئازی و فاکتورهای مربوط که شامل RNase III Dorsha و DGCR8/Pasha می‌باشد، به pre-miRNA با طولی معادل 50-80 باز،

دارای ساختار stem-loop تبدیل می‌شود (۵۴، ۵۵). این ساختارها دارای ساختمان دوم با مناطقی از dsRNA که دارای جفت شدگی با اشتباه می‌باشند، در مراحل بعد بریده شده و تبدیل به یک یا تعداد بیشتری miRNA می‌شوند.

مولکولهای pre-miRNA توسط یک فاکتور وابسته به GTP به نام exportin-5 به صورت فعال از هسته خارج شده و وارد سیتوپلاسم می‌شود و در آنجا تحت تاثیر نوکلئاز RNase III – like به نام Dicer تبدیل به یک RNA دو رشته‌ای می‌گردد که هر رشته دارای 20-24 نوکلئوتید می‌باشد و یکی از این رشته‌ها، miRNA بالغ می‌باشد (شکل ۱-۱۰). (۵۶، ۵۷). سپس این دو رشته از یکدیگر جدا شده و رشته‌ای که miRNA بالغ است وارد کمپلکس سیتوپلاسمی به نام RISC^{۲۸} می‌شود. در اینجا به نظر می‌رسد رشته‌ای وارد کمپلکس می‌شود که انتهای 5' آن اتصال ضعیف تری با رشته مکملش دارد (۵۸، ۵۹). در نهایت miRNA بالغ با اتصال به توالی خاصی در ناحیه 3'-UTR در mRNA هدفش نقش تنظیمی خود از طریق مهار ترجمه و یا القا تجزیه mRNA را اعمال می‌کند (۵۰).

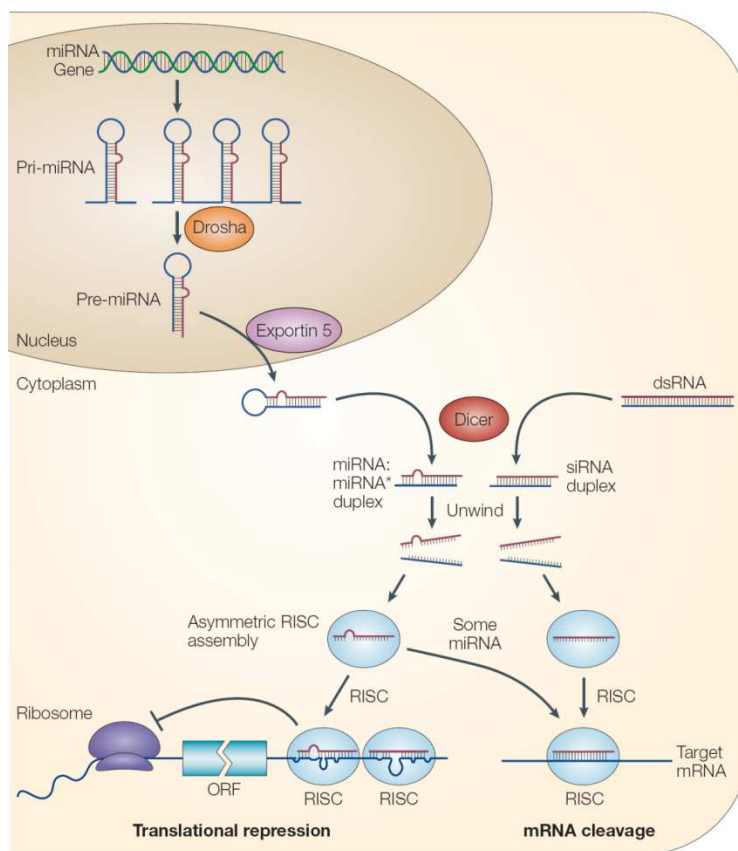
تنها یکی از دو رشته miRNA دارای عملکرد تنظیمی می‌باشد و به رشته دیگر miRNA* گفته می‌شود (۴۸، ۵۰).

miRNA بالغ می‌تواند از طریق جفت شدن با اشتباه با mRNA هدف در ناحیه 3'-UTR باعث توقف و مهار ترجمه شود. اگر اتصال miRNA با ملکول mRNA هدف به صورت جفت شدن بدون اشتباه باشد، موجب تجزیه mRNA می‌گردد که این فرآیند مشابه با تجزیه القا شده توسط siRNA می‌باشد، شکل (۱-۱۱).

شکل‌گیری RISC برای siRNA در شرایط آزمایشگاهی^{۲۹} گزارش شده است و احتمالاً شکل‌گیری این کمپلکس برای miRNA نیز به صورت مشابهی صورت می‌پذیرد ولی ارتباط بین بلوغ نهایی miRNA و شکل‌گیری RISC هنوز مشخص نیست.

²⁸ RNA-induced silencing complex

²⁹ Invitro



شکل ۱-۱۱. انواع مهار ژن توسط میکرو RNA

در مطالعاتی که روی Zebra fish انجام شده نشان داده شد که ساختمان حلقه-ساقه موجود در pre-miRNA در انتخاب رشته‌ای که باید تبدیل به miRNA بالغ شود - طی شکل‌گیری RISC - نقش دارد. این یافته‌ها همچنین بیانگر آن هستند که ساختمانی دو رشته‌ای مشابه siRNA برای شکل‌گیری miRISC در شر/یطد/خل بدن موجود زنده^{۳۰} چندان ضروری نمی‌باشد و قانع‌کننده است اگر چنین فرض شود که ساختمان Stem-loop در تسهیل فرآیند انتخاب و بلوغ رشته صحیح نقش داشته باشد. مسیرهایی که برای Biogenesis ملکول‌های miRNA پیشنهاد شده‌اند همه بر اساس مطالعات انجام شده روی siRNA در شرایط *invitro* هستند و به این دلیل هنوز برای مشخص شدن خصوصیات دقیق و تفاوت‌های عملکرد Dicer و RISC و miRNA احتیاج به بررسی و مطالعات بیشتر می‌باشد (۴۸، ۵۰).

³⁰Invivo

۱-۸-۲- مقایسه میکرو RNA با RNA کوچک مداخله گر

در تفاوت با siRNA دورشته‌ای، miRNA نوعی RNA تک رشته‌ای به طول 18-25nt می‌باشد که از یک RNA بلند رونویسی شده از روی یک بخش DNA منشا گرفته است (pri-miRNA). تفاوت دیگر میان siRNA و miRNA در نحوه اتصال آنها به mRNA هدف‌شان می‌باشد به این صورت که اتصال miRNA به mRNA هدف به صورت جفت شدن با اشتباه و به ناحیه 3'-UTR می‌باشد درحالی‌که siRNA اتصالش به mRNA شکل کاملاً جفت شده^{۳۱} و به ناحیه کدکننده پروتئین در mRNA هدف می‌باشد. به علاوه اتصال miRNA به mRNA هدف و ایجاد RNA دو رشته‌ای تنها در بعضی موارد باعث تجزیه mRNA در فرآیندی شبیه RNAi می‌شود و در بیشتر موارد این اتصال تنها باعث جلوگیری و مهار توجه می‌شود، بدون اینکه mRNA هدف تجزیه گردد (۵۰).

تفاوت دیگر میان siRNA و miRNA در بیوسنتز آنها می‌باشد. تولید هر یک از این RNAهای کوچک در برخی مراحل مشابه است ولی در دیگر جنبه‌ها با یکدیگر تفاوت دارند. هر دو به وسیله RNase III Dicer از یک ساختمان پیچیده یا دورشته‌ای RNA پیش‌ساز بریده می‌شوند. اگرچه اخیراً به نظر می‌رسد که این دو توسط اعضای مختلفی از خانواده Dicer به طور اختصاصی چه در هسته و چه در سیتوپلاسم برش می‌خورند. همچنین نقش اعضای خانواده ژن آگونات (AGO)^{۳۲} نیز در شکل‌گیری و یا عملکرد siRNAs و miRNAs نشان داده شده است. در پروتئین AGO I به عنوان یک پروتئین کلیدی برای هر دو مسیر siRNA و miRNA موردنیاز است و به نظر می‌رسد که اندونوکلاز مسئول برش mRNA هدف در کمپلکس RISC همین AGOI می‌باشد (۴۸، ۵۰).

³¹Perfect pairing

³²Agonaute

اختلاف دیگری که این دو در مسیر بیوسنتز خود دارند مربوط به فاکتور ویروسی مهارکننده خاموشی^{۳۳}، یعنی جزء کمکی پروتئیناز (HC-pro)^{۳۴} می باشد که این فاکتور باعث حذف siRNAs و در مقابل باعث افزایش و تجمع miRNAs می گردد (۶۰).

miRNA ها به عنوان یک عامل درمانی بالقوه نسبت به siRNA ها ارجحیت دارند زیرا اولاً dsRNAs بلندتر از 25bp و یا مقادیر بالای siRNA باعث تجزیه غیراختصاصی و وابسته به اینترفرون RNA در سلول های پستانداران می شوند. ثانیاً siRNAs در شرایط *invivo* بی ثبات هستند و در موش برای ایجاد پاسخ درمانی نیاز به دوزهای بالای دارویی دارند. ثالثاً به دلیل اتصال کامل و بدون اشتباه ملکول های siRNA به RNA هدف که لازم فعال شدن و القای مکانیزم RNAi می باشد (۵۰).

۱-۸-۳. روش های شناسایی میکرو RNA ها

در حال حاضر چهار روش اصلی برای شناسایی miRNAs وجود دارد که شامل:

- کلونینگ مستقیم^{۳۵}

- جستجوی ژنوم با استفاده از رایانه^{۳۶}

- جستجوی میکرو RNA ها با استفاده از تکنیک میکرو آری در گونه های مختلف^{۳۷}

- ساخت miRNA به صورت آزمایشگاهی و هدف قرار دادن توالی های شناخته شده ژن

³³Silencing inhibitor

³⁴Helper component proteinase

³⁵Direct cloning

³⁶Computer search of the genome

³⁷MiRNA microarray search in different species

۱-۳-۸-۱. کلونینگ مستقیم

کلون مستقیم ملکول‌های کوتاه RNA، همچنان که برای let-7 و lin-4 انجام شده هنوز روش انتخابی برای شناسایی miRNAs جدید می‌باشد. پس می‌توان RNAهای کوچک را جدا کرده و توالی هر کدام را مشخص نمود. زمانیکه miRNA شناسایی شود، نقش آن در دیگر موجودات از جمله انسان قابل بررسی و کشف است. برای مثال let-7 ابتدا در C.elegans شناسایی شده به دنبال آن کاهش بیان let-7 و آنزیم Dicer در سرطان ریه در انسان دیده شد. پس می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که تغییر در بیان let-7 اثرات زیست‌شناختی و بالینی دارد (۶۱، ۴۸).

۱-۳-۸-۲. جستجوی ژنوم با استفاده از رایانه

روش‌های متعدد کامپیوتری برای تخمین تعداد ژن‌های miRNA در جانداران مختلف وجود دارد. اصول پایه این قبیل برنامه‌ها شناسایی نواحی غیرکدکننده ژنوم است که به شدت در طی تکامل حفظ شده‌اند و توانایی تشکیل یک ساختار حلقه-ساقه را دارند. به علاوه خصوصیتی همچون وجود لوپ‌های کوچک داخلی، bulged loop و لوپ‌های نامتقارن در شناسایی miRNAs کمک می‌کنند (۶۱، ۴۸). miRNAهایی که با این روش شناسایی می‌شوند بسیار هتروژن‌تر از miRNAهایی هستند که به طور تجربی کشف می‌شدند.

از سویی دیگر قسمت اعظمی از الگوریتم‌های موجود تلاش برای پیش‌بینی اهداف هر miRNA دارند. این نرم‌افزارها miRNA را از لحاظ برخورداری توالی seed اختصاصی بررسی می‌کنند (۸ نوکلئوتید اول miRNA از سمت 5' و توانایی اتصال این ۸-۱۰ نوکلئوتید اول به ژن نیز بررسی می‌شود. سپس کل ساختمان از نظر اتصال با ژن از جهت 5'→3' و 3'→5' چک می‌شود.

اگرچه تکنیک‌های این چینی می‌توانند میزان بالایی از مثبت کاذب^{۳۸} را داشته باشند. بنابراین ارزشیابی miRNAهای شناسایی شده به وسیله تست‌هایی از قبیل northern blot و مطالعات و بررسی‌های

³⁸ False alarm or false positive

عملکردی^{۳۹} روی این ژن‌ها ضروری می‌باشد. این روش‌ها همچنان در حال پیشرفت و تکامل هستند زیرا چند miRNA می‌توانند یک ژن هدف داشته باشند و یک ژن ممکن است هدف چندین miRNA باشد (۴۸). به طور مثال الگوریتم Targetscan برای miR-H2 تعداد ۲۴۰ ژن هدف را پیش‌بینی کرده‌است. که مسلماً به طور واقعی تمامی این ژن‌ها توسط این miRNA کنترل نمی‌شوند.

۱-۳-۳-۸-جستجوی میکروRNA ها با استفاده از تکنیک میکرواری در گونه های مختلف

برای تسهیل بررسی‌های فوق میکروچیپ‌های الیگونوکلوئیدی برای تعیین خصوصیات miRNA^{۴۰} در ژنوم بافت‌های مختلف در گونه‌های مختلف ساخته شد. برخی از این چیپ‌ها دارای الیگونوکلوئیدهای تغییر یافته LNA می‌باشند که این خصوصیت آنها را قادر می‌سازد علاوه بر تعیین خصوصیات بیان miRNAs توانایی انجام miRNA in situ hybridization را نیز داشته باشند. پس این روش نیز قادر به شناسایی گروه بزرگی از miRNA ها و نقش تنظیمی‌شان می‌باشد.

۱-۳-۴-ساخت miRNA به صورت آزمایشگاهی و هدف قرار دادن توالی‌های شناخته شده ژن

در بررسی‌های انجام شده مشخص شد که در سلول‌های انسان و موش، ساخت پیش‌ساز miRNA از 5' نواحی اینترونی توسط RNA پلی‌مراز II صورت می‌گیرد و از این خصوصیت به سود ساخت وکتورهایی با توانایی القا تولید miRNA استفاده شده است. با استفاده از اینترون‌های مصنوعی دارای ساختار Hairpin مشابه با پیش‌ساز miRNA این امکان به وجود می‌آید که پس از ورود این اینترون‌ها به ژن، miRNAهای بالغ به وجود آیند و این ملکول‌های miRNA می‌توانند موجب بروز خاموشی ژن^{۴۱} در سلول‌های سرطانی پروستات و دهانه رحم انسان و سلول‌های بنیادی عصبی موش و Zebra fish و پرندگان و موش‌ها در شرایط داخل بدن موجود زنده شوند. همچنین می‌توان با استفاده از پروموتورهای اختصاصی برای هر سلول بیان miRNA را مختص به سلول‌هایی خاص نمود (۶۳، ۶۱).

³⁹Functional

⁴⁰MiRNA profiling

⁴¹Gene silencing

درفاز پیش مطالعاتی این پروژه تحقیقاتی از فرایند جستجوی ژنوم با استفاده از رایانه و ساخت miRNA به صورت آزمایشگاهی (miR-135) و هدف قرار دادن توالی‌های شناخته شده ژن استفاده شده (INSR) و در ادامه پروژه در فاز اجرایی از مسیر کلونینگ مستقیم استفاده شده است.

۹-۱- نقش miRNA در دیابت نوع دو

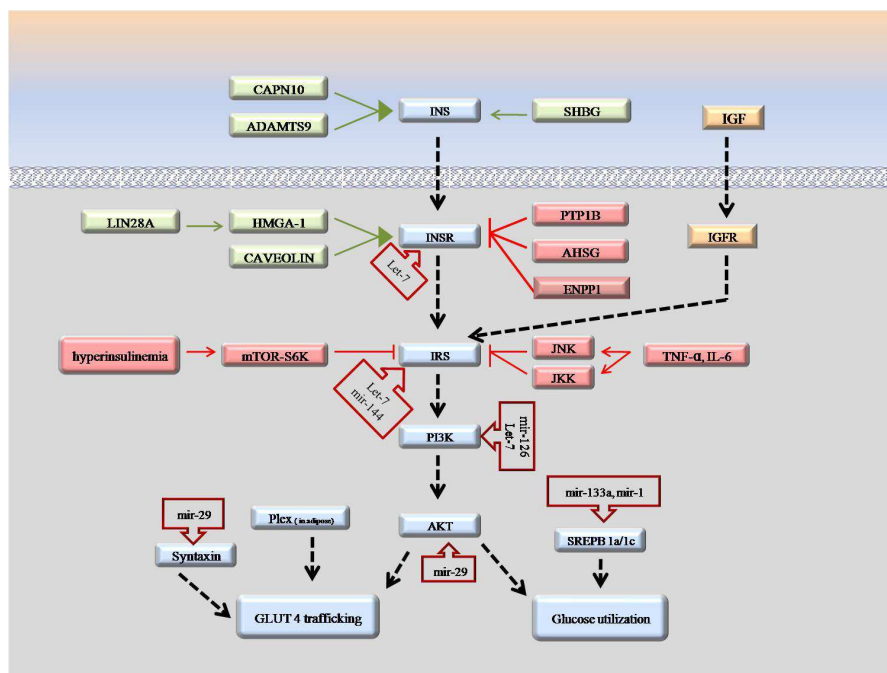
نقش miRNA و همراهی با دیابت نوع دو اول بار در سال ۲۰۰۴ مورد بررسی قرار گرفته و به نظر می‌رسد به دلیل چند سیستمی و چند فاکتوری بودن بیماری، miRNA های بیشتری نیز شناسایی شوند (۶۴).

بیش از ۵۰۰ miRNA در انسان ۷۴-۹۰٪ mRNA های کد کننده پروتئین ها را تنظیم می‌کنند (۱۱). وجود miRNA برای تکامل پانکراس، تنظیم ترشح انسولین تحریک شده توسط گلوکز، کاتابولیسم اسید های آمینه، ساخت اسید چرب در سلولهای کبد، تمایز بافت چربی و میوبلاست و میوژنز ضروری است (۶۵).

miRNA به عنوان تنظیم کننده RNA ایی هومئوستاز گلوکز با هدف گیری ژنهای درگیر در ساخت انسولین، تمایز سلولهای β پانکراس و عوامل درگیر در اگزوسیتوز انسولین می‌تواند نقش مهمی در ایجاد بیماری مذکور ایفا کند (۶۶). برخی miRNA ها در حالت هایپرگلاسمیک در بافت های عضله و چربی و کبد و پانکراس افزایش می‌یابند در حالیکه عکس این اتفاق برای گروه دیگری از miRNA ها رخ می‌دهد (۷). در مطالعات موشی تعداد ۲۹ miRNA مرتبط با دیابت نوع ۲ شناسایی شده که الگوی برخی از آنها با ایجاد وضعیت هایپرگلاسمیک تغییر کرده و در موشهای GK به عنوان عوامل موثر در پاتوژنسیته دیابت نوع دو معرفی شده اند (۶۷).

در مطالعه ایی که در سال ۲۰۱۰ به چاپ رسیده با بررسی پروفایل miRNA پلاسما میان افراد سالم و افراد مبتلا، تعدادی miRNA مشترک و miRNA متفاوت به ثبت رسیده است (۶۸). و در بررسی دیگری که روی ۸۰ بیمار مبتلا به بیماری که برای یک دوره ۱۰ ساله پیگیری می‌شدند تغییر الگوی miRNA در بافت های مقاوم به انسولین سالها قبل از بروز دیابت دو نمایش داده شده است (۶۹، ۷۰). با توجه به مطالعات منتشر شده و معتبر علمی شکل ۱-۱۲ به معرفی مهم ترین کاندیدا های ژنی و miRNA های تنظیم کننده آنها

پیدا شده است. با محکم تر شدن نشانه ها و مطالعات شاید بتوان سالها قبل از بروز علائم بیماری به وجود آن پی برده و حداقل از عوارض جدی آن پیشگیری نمود.



شکل ۱-۱۲. نمایی از miRNA دخیل در پروسه ایجاد مقاومت به انسولین و اهداف مولکولی آنها

۱-۱۰- اهمیت موضوع و ضرورت انجام تحقیق

مطالعات association، وجود ارتباط میان ژنها و ایجاد دیابت دو ثابت می کند(۶۹). ژنهای زیادی در ترکیب با هم در بروز بیماری دخیل هستند که بسته به قومیت نیز با هم متفاوتند. بنابراین مطالعات linkage نمی تواند با قدرت ژنهای حساس را شناسایی کند(۱۱). به طور مثال ۹ ناحیه ژنی در بیماران ژاپنی، سفید پوستان فرانسوی و آمریکایی، حاوی ژنهای حساس به دیابت دو شناسایی شده که مهمترین آن 3q26-q28 (حاوی ژن ادیپونکتین) می باشد. اما همراهی این نواحی در برخی جمعیت های دیگر تکرار نشده است(۱۱).

تاکنون یک یا دو ژن اصلی و تعداد زیادی ژن فرعی در پاتوژن دایات دو دخیل شناخته شده اند اما ارتباط کامل آنها هنوز شناسایی نشده است. ژنهای دخیل در پیام رسانی انسولین، انتقال گلوکز، سنتز گلیکوژن، جذب و سنتز اسید چرب، و تمایز سلولهای چربی از جمله کاندیدا های ژنی صلاحیت دار معرفی شده اند (۸).

از سال ۲۰۰۷ با استفاده از روش (GWA) genom wide association scanning مطالعه جدی روی ژنهای مرتبط با این بیماری آغاز شده است (۱۱) و نزدیک ۴۰ ژن که احتمالا با ایجاد بیماری ارتباط دارند، معرفی شده اند (۷۰). برخی از این ژن ها در ایجاد حساسیت به انسولین محیطی دخیل بوده و به عنوان مثال تعدادی از آنها مانند LIN28B، ADIPOQ و... می توانند در عضله اسکلتی و بافت چربی حالت مقاومت به انسولین را ایجاد نمایند.

به طور کلی نقص در مسیر تولید و ترشح انسولین و مسیر AMPK در پاتوژنز دیابت نوع دو دخیل هستند. مسیر AMPK ضد دیابت بوده و با ایجاد حساسیت به انسولین در خلال ورزش و دخالت در پیام رسانی آدیپونکتین و مهار تولید گلوکز کبدی به حفظ سلامت بدن کمک میکند (۴۲). ایجاد اختلال در فعالیت هر دو مسیر باعث از بین رفتن وضعیت نرمال بدن می گردد. به نظر می رسد در بیماران دیابت نوع دو miRNA های ژنهای ترشح انسولین کاهش و miRNA های ژنهای مها رکننده ترشح و اگزوسیتوز انسولین افزایش می یابند (۷۱). miRNA با تمرکز روی بیولوژی سلول β پانکراس، ایجاد مقاومت به انسولین و پیچیدگی های دیابتی می تواند در بروز دیابت نوع دو مؤثر باشد (۶۴). بیان miRNA بسیار اختصاصی بافت بوده و وجود SNP در miRNA ها باعث تغییر تنظیم رونویسی و پایداری آنها می گردد (۶۵).

به هر حال تا کنون مطالعات زیادی روی رابطه ژنها و miRNA های مرتبط با پاتوژنز دیابت دو به صورت توام صورت نگرفته و یا اکثرا روی موش یا سلولهای بافت موشی آزموده شده اند. شناسایی ارتباط میان miRNA های کلیدی که ژنهای حساس و دخیل در پاتوژنز دیابت دو را کنترل می کنند از نظر کلینیکی بسیار مهم است زیرا علاوه بر شناخت صحیح و روشن مسیر بیماریزایی دیابت نوع دو، راه را برای شناسایی روش های پیشگیرانه و یا درمانی مؤثر تر هموار می سازد. همچنین معرفی دقیق miRNA های مرتبط با ژنهای مداخله کننده در بیماری خصوصا مرحله ایجاد مقاومت به انسولین به عنوان سر منشاء ایجاد بیماری، می تواند استفاده آنها را به عنوان بیومارکر های تشخیص دقیق بیماری نیز اعتبار ببخشد. برای نیل به این هدف می توان می-توان در گام اول به صورت بیوانفورماتیک احتمال چنین فرایند تنظیمی را برای miRNA های انسانی را بر روی بیان ژنهای دخیل در پروسه ایجاد مقاومت به انسولین بررسی نمود. سپس کاندیدهای تایید شده برای این نوع تنظیم را طی فرایند آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داد. با توجه به اینکه در برخی مطالعات به حرکت

miRNA ها از بافت تولیدی به بافت هدف نیز اشاره شده است (۷۱) می توان با استفاده از miRNA های کلیدی در پژوهش های بعدی روش های درمانی با حداقل تهاجم را جهت جلوگیری از پیشرفت بیماری عرضه داشت. به هر حال به اعتراف اکثر محققان شناسایی دقیق miRNA های دخیل در پاتوژنز بیماری به عنوان اولین و مهمترین گام در عرصه مبارزه با بیماری دیابت نوع دو، خواست جامعه علمی بوده و امید است این طرح گامی در جهت پیشبرد این هدف برداشته باشد.

فصل دوم

مروری بر اهداف و فرضیات

۱-۲- اهداف طرح

۱-۱-۲- هدف اصلی

الف: بررسی نقش miR-135 از طریق کنترل میزان بیان ژن INSR دخیل در فرایند مقاومت به انسولین ایجاد شده در سلول عضلانی در شرایط *in vitro*

۱-۲-۲- اهداف فرعی

الف : miR-135 فرایند مقاومت به انسولین در سلول عضلانی در شرایط *in vitro* کنترل می کند (این کنترل در سطح اتصال نیم‌بند به سر 3'UTR بررسی می‌شود)

ب: miR-135 بر روی بیان ژن INSR دخیل در ایجاد مقاومت به انسولین در سلول عضلانی در شرایط *in vitro*، تاثیر می‌گذارد.

۱-۳- اهداف کاربردی

الف : می توان miR-135 را به عنوان بیو مارکر مناسب جهت پیش آگهی از بروز بیماری دیابت تیپ ۲ و یا اهداف درمانی آن در تحقیقات آتی معرفی کرد

۱-۲-۲- فرضیات

الف :نتایج آزمایشگاهی قداراست که نحوه تنظیم بیان ژن INSR را به عنوان یکی از ژنهای مولد فرایند مقاومت به انسولین را توسط miR-135 ، مشخص و تایید نماید.

۳-۲- متغیرها

جدول ۲- ۱: جدول متغیرها. متغیرهای مورد آزمایش، تعریف علمی هریک و مقیاس اندازه گیری آن ها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	نسبی	رتبه ای		
miR-135	✓				✓		miRNA ها دسته ای از RNA های کوچک را شامل می شوند و می توانند ژنها را از طریق مکانیسم های تنظیمی منفی (تخریب یا دلتزیله کردن mRNA و یا مهار ترجمه) کنترل نماید.	توالی ژنی
ژن INSR	✓				✓		ژنهایی که در اثر عدم فعالیت ویا عدم حضور پروتئین کد شوند در ملول حالت مقاومت به انسولین را ایجاد خواهند کرد.	توالی ژنی
لایه سلول C2C12	✓	✓			✓		ملول هدف هورمون انسولین	
مقاومت به انسولین		✓				✓	نقص توانایی ملول در مسیر پیام رسانی انسولین و عدم جذب گلوکز	تأثیری در جذب گلوکز
میزان نسبی بیان ژن INSR		✓	✓				میزان ترجمه ژن به پروتئین حاصلگرددی که با نواید mRNA حاصلگرددی مشخص می شود.	بهره بیانگاری
میزان نسبی بیان miR-135		✓	✓				میزان رونویس از ژن mRNA که با نواید miRNA حاصلگرددی و کاهش حضور mRNA حاصلگرددی ژن هدف مشخص می شود.	بهره بیانگاری

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱-مواد مورد استفاده

۳-۱-۱-آنزیم ها

الف). برای انجام PCR و RT-PCR و Real-Time PCR

همه آنزیمهای مورد استفاده از شرکت Fermentas (Germany) خریداری شدند.

جدول ۳-۱: آنزیمهای مورد نیاز PCR و RT-PCR و Real-Time PCR

Component	Code number
Taq DNA polymerase	EP0402)#(
RevertAcidM-MuLV Reverse Transcriptase	EP0441)#(
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X	K0222)#(

ب). برای کلون کردن قطعه و تایید وکتور از آنزیمهای زیر استفاده شد:

BamHI(#10220612001)

xbaI(#10674257001)

T4 DNA Ligase, 5 U/μl (#EL0014)

۳-۱-۲- محیط های کشت

الف). محیط کشت و ذخیره سازی باکتری

محیط کشت LB Broth برای کشت ، تکثیر و ذخیره سازی باکتری

محیط کشت LB Agar برای کشت و انتخاب آنتی بیوتیکی باکتری های حاوی وکتور

بعد از توزین مواد، آنها را به کمک حرارت در مقدار مناسب آب دوبار مقطر (DDW)^{۴۲} حل کرده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد با فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو می گردد.

محیط کشت LB^{۴۳} حاوی تریپتون و عصاره مخمر است. تریپتون حاوی اسیدهای آمینه و پتیدیهای کوچک است و همچنین عصاره مخمر تأمین کننده نیازهای نیتروژنی همراه با قند و مواد آلی و معدنی می باشد.

محیط کشت حاوی باکتریها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در انکوباتور حاوی شیکر با دور ۱۵۰ تا ۲۵۰ در دقیقه قرار داده می شود. در این شرایط باکتری هر ۲۰ دقیقه یکبار تقسیم شده و غلظت آنها در محیط کشت شبانه به حداکثر مقدار خود یعنی $10^9 \times 3-2$ سلول در هر میلی لیتر خواهد رسید.

ب). محیط های کشت سلولی

محیط کشت DMEM^{۴۴} برای کشت رده های سلولی چسبنده که با ۱۰٪ FBS بکار برده می شود.

۳-۱-۳- آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک آمپی سیلین (داروسازی دانا، تبریز، ایران)، برای انتخاب، تکثیر و تخلیص پلاسمید از سلول باکتریایی

آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین (داروسازی دانا، تبریز، ایران) برای تهیه محیط کشت های سلولی

۳-۱-۴- کیت ها

کیت تخلیص پلاسمید High-Yield Plasmid Extraction (RBC Bioscience, Korea)

QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Germany)

⁴² [Double distilled water](#)

⁴³ [Luria-Bertani](#)

⁴⁴ Dulbecco's Modified Eagle's Medium

کیت تخلیص DNA از ژل (QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany)

کیت استخراج DNA (QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany)

کیت 3. COBAS INTEGRA Glucose HK Gen (Roch, Germany)

۳-۱-۵-سلول ها

الف. سلول های یوکاریوتی (از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند).

سلول های C2C12 با منشاء عضله اسکلتی موش

ب. سلول های پروکاریوتی (از مرکز تحقیقات و فناوری بنیافته تهیه شدند).

سوش های باکتریایی E.coli نوع DH5α و Stbl4

۳-۱-۶-مواد لازم برای ایمونوفلورسانس

فرمالدهید ۲٪ ، آنتی بادی های اولیه ، آنتی بادی ثانویه متصل به FITC (AF8035; RaziBioTech)

، PBS/FBS: PBS, pH 7.4 containing 10% FBS, (Invitrogen Cat. # D1306) DAPI

Tritonx100/PBS/FBS: 0.3% Triton x100/PBS/FBS

۳-۱-۷-سایر مواد

انسولین (سیگما) ، نمک های فسفات سدیم، کلرید سدیم، کلرید منیزیم، تریس، EDTA، استات سدیم، اتانل،

متانول، ایزوپروپانل، dNTP، آگارز، انواع پودرهای محیط کشت باکتری، اتیدیوم برماید، FBS ، RNX-Plus،

بافر TAE 40X برای الکتروفورز DNA ، بافر PBS ، گلیسرول ۶۰٪ و ۱۰٪ و...

۳-۱-۸-بافر ها

(۱) بافر آنزیم Taq از شرکت سیناژن

(۲) بافر آنزیم Reverse Transcriptase از شرکت سیناژن

(۳) بافر موجود در Master Mix شرکت Fermentaz

(۴) بافر TAE 40X برای الکتروفورز DNA

(۵) بافر Red 10X برای فعالیت آنزیم های محدود کننده XbaI, Bam HI از شرکت Fermentaz

(۶) بافر T4 10X برای فعالیت آنزیم T4 DNA Ligase از شرکت Fermentaz

(۷) بافر PBS برای شستشوی سلول ها

۳-۱-۸-۱-بافر نمکی ^{۴۵}PBS فاقد کلسیم / منیزیم

NaCl - ۸ گرم

KCl - ۰/۲ گرم

Na₂HPO₄ - دو آب ۱/۴۴ گرم

K₂H₂PO₄ - ۰/۲۴ گرم

مواد فوق را با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه آن را اتوکلاو کرده و در دمای اتاق می توان نگهداری نمود.

۳-۱-۸-۲-محلول تریپسین - ^{۴۶}EDTA

۰/۲۵ گرم

- پودر تریپسین (BRL ، Gibco)

^{۴۵}. Phosphate Buffer Saline

^{۴۶}. Trypsin-Ethylenediamine Tetra Acetic Acid

۰/۰۴ گرم

- پودر EDTA (Gibco ، BRL)

مواد فوق را با PBS به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده، بعد از حل شدن مواد در PBS محلول حاصل با فیلتر میلی پور، فیلتر شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

۳-۴-۹- وسایل یک بار مصرف

فلاسک کشت سلولی (25 ml, 75 ml)، پلیت کشت سلولی (6 well, 96 well)، پلیت ۱۰ cm، میکروتیوب (0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml)، فالكون (15 ml, 50 ml)، پیپت پاستور، پیپت مدرج (1 ml, 2 ml, 5 ml)، بشر، استوانه مدرج، کاغذ صافی، فیلتر 0.2mm مخصوص فیلتراسیون، سر سمپلر (زرد، آبی، کریستالی)، ..

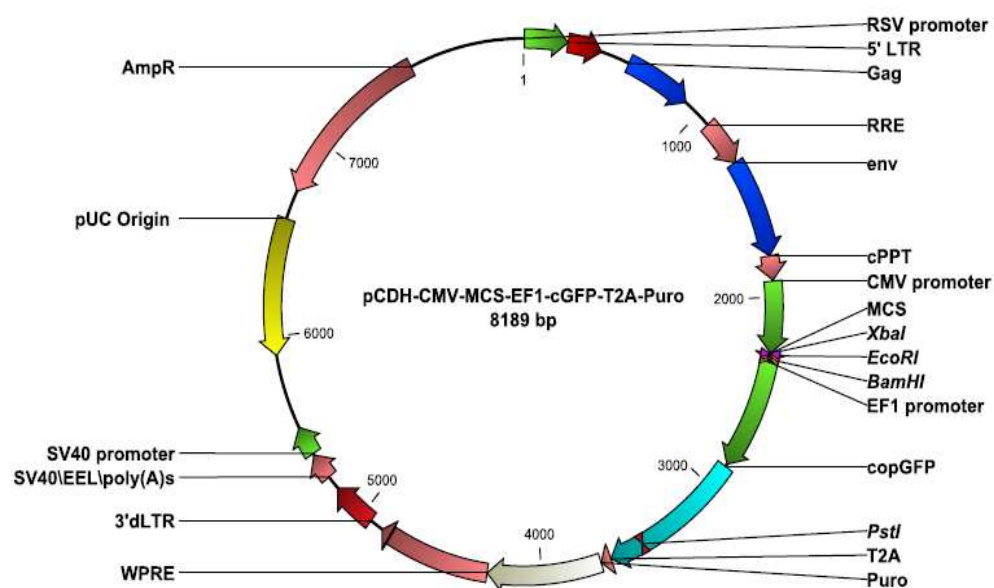
۳-۱-۱۰- دستگاه ها

دستگاه سانتریفوژ (دور بالا و معمولی)، انکوباتور، فور، اتوکلاو، ترموسایکلر Real- Time و End point PCR، هود لامینار، میکروسکوپ معمولی و معکوس و فلوئورسنت، یخچال، فریزر معمولی و ۷۰- درجه، تانک ازت، بیوفتومتر، دستگاه الکتروفورز، لامپ UV، هات پلیت، ترازوی حساس، بن ماری ۴۲ درجه و ۱۰۰ درجه سانتی گراد، دستگاه Gel-Doc، دستگاه COBAS® INTEGRA 400 plus.

۳-۱-۱۱- وکتورهای مورد استفاده

T/A vector (RBC Bioscience, Taiwan)

pCDH-cGFP vector (Open Biosystems, USA) (شکل ۳-۱)



شکل ۳-۱: نقشه وکتور استفاده شده در پژوهش

وکتور pCDH از خانواده وکتور های مشتق از لنتی ویروس ها بوده و ژن الحاقی را تحت پروموتور CMV بیان می کند. این وکتور دارای ژن شاخص GFP بوده که تحت اثر پروموتور EF1 بیان شده و سلولهای حاوی وکتور دارای درخشش سبز رنگ در نمای میکروسکوپ فلورسنت خواهند بود. شاخص انتی بیوتیکی انتخابگر این وکتور در سلولهای پروکاریوتی امپی سیلین و در سلولهای یوکاریوتی پرومایسین می باشد. سایت برش انزیمی مناسبی برای وکتور طراحی شده است. و با توجه به تکثیر مناسب وکتور در سلولهای پروکاریوتی و یوکاریوتی این وکتور انتخاب مناسبی جهت دستکاری های ژنتیکی پایدار (توانایی الحاق ژنوم نو ترکیب به ژنوم سلول یوکاریوتی میزبان -ارجحیت آن نسبت به وکتور های پلاسمیدی- و بیان پایدار پروتئین نو ترکیب) به شمار می رود. با توجه به خریداری وکتور pCDH توسط مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته بعد از تصویب پروپوزال و به علت کارایی بسیار بهتر این وکتور نسبت به وکتور لنتی ویروسی *plex* در انجام این پژوهش و پروژه های وابسته به این بررسی از وکتور pCDH استفاده شد.

۳-۲- روش کار

در مرحله پیش مطالعاتی این پروژه ابتدا توسط بررسیهای بیوانفورماتیک امکان اتصال میکرو RNA های پستانداران به ناحیه 3'UTR ژنهای دخیل در فرایند ایجاد مقاومت به انسولین مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از انتخاب یک ژن با بیشترین احتمال هدف گیری توسط miRNA میزان فعالیت این ناحیه ژنی در حضور miRNA توسط روش realtime ارزیابی گردید. مراحل انجام کار به طور خلاصه به شرح زیر می باشد:

- ۱- استخراج DNA از بافت موش به منظور یافتن ژن miR-135 .
- ۲- طراحی پرایمر جهت تکثیر ژن miR-135 و PCR آن به جهت کلونیک
- ۳- طراحی پرایمر جهت تایید حضور miR-135 مورد نظر در سلول C2C12.
- ۴- طراحی پرایمر به منظور رد یابی بیان ژن INSR در سلول C2C12
- ۵- تکثیر ژن miR-135 با استفاده از PCR انجام شده بر روی استخراج DNA از بافت موش
- ۶- تخلیص قطعات مورد نظر از روی ژل و هضم آنزیمی.
- ۷- کلون کردن ژن miR-135 در وکتور TA
- ۸- ترانسفورم miR-135 TA vector در داخل باکتری میزبان و تکثیر باکتری در حجم مورد نظر.
- ۹- استخراج پلاسمیدهای miR-135 TA vector از باکتری
- ۱۰- هضم آنزیمی با آنزیمهای اختصاصی کلونینگ
- ۱۱- تهیه میزان مناسب وکتور بیانی pCDH.
- ۱۲- کلون سازی ژن miR-135 در وکتور بیانی pCDH
- ۱۳- ترانسفورم miR-135 pCDH در داخل باکتری میزبان و تکثیر باکتری در حجم مورد نظر.
- ۱۴- استخراج پلاسمیدهای miR-135 pCDH از باکتری.
- ۱۵- تایید کلونینگ با توالی یابی قطعه در داخل وکتور.
- ۱۶- ترانسفکت وکتور و بیان pCDH - miR-135 در سلول عضلانی C2C12 .
- ۱۷- ترانسفکت وکتور بیانی فاقد ژن مذکور در سلول مدل به عنوان کنترل منفی.

۱۸- ایجاد حالت مقاومت با انسولین در لاین سلولی عضلانی C2C12 با استفاده از دوز مزمن انسولین به

عنوان کنترل مثبت

۱۹- انجام واکنش Real-Time جهت تایید حضور miR-135 در سلول C2C12 ترنسفکت شده و مقایسه با

سلول‌های محتوی وکتور کنترل منفی.

۲۰- انجام واکنش Real-Time جهت بررسی میزان بیان نسبی بیان ژن INSR در سلول C2C12

ترنسفکت شده و مقایسه با سلول‌های محتوی وکتور کنترل منفی

۲۱- انجام تست سنجش جذب قند جهت تایید حالت ایجاد حالت مقاومت با انسولین در لاین سلولی عضلانی

C2C12 ترنسفکت شده با miR-135 و مقایسه با سلول‌های محتوی وکتور کنترل منفی و سلول سالم

بدون وکتور

۳-۲-۱- مطالعات بیوانفورماتیک در فاز پیش مطالعاتی

این قسمت از فرایند انتخاب بیوانفورماتیکی ژن INSR و miR-135 در فاز پیش مطالعاتی انجام پذیرفته

است که به منظور روشن سازی روند کار مراحل به اختصار بیان می گردد.

۳-۲-۱-۱. جستجوی ژن مناسب و پیش بینی miRNA هدف گیرنده 3'UTR آن:

پس از مطالعات انجام شده و بررسی مقالات متعدد، ژن INSR از مسیر سیگنالینگ هورمون انسولین بعنوان

یکی از ژنهایی که در پروسه ایجاد مقاومت به انسولین نقش دارند انتخاب شد (شکل ۳-۲).

روال یک اتصال کلاسیک کامل بین miRNA و mRNA اتصال برقرار است و در موقعیت ۸ نیز اتصال کامل وجود دارد.

۳-۲-۱-۱-۲- نرم افزار miRWalk

این پایگاه داده های مربوط به miRNA بصورت اولیه و ثانویه به آدرس (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>) است که اطلاعات miRNA از انسان، موش و رت را که اهداف آنها پیش بینی و یا بصورت تجربی تأیید شده است در اختیار قرار می دهد. الگوریتم بکار رفته در این نرم افزار براساس پیش بینی محل اتصال miRNA در توالی های کامل تمام ژنوم های شناخته شده (حتی میتوکندری) در موجودات نامبرده است

۳-۲-۱-۱-۳- نرم افزار miRanda

یک منبع اطلاعاتی قابل دسترسی از طریق آدرس (<http://www.microrna.org>) می باشد و در مرکز بیولوژی کامپیوتری مرکز سرطان Memorial Sloan-Kettering قرار گرفته است. این نرم افزار مجموعه کاملی از پیشگویی های miRNA برای اهداف و همچنین پروفایل بیانی آنها در موجودات مختلف است.

۳-۲-۱-۱-۴- نرم افزار Diana-microT

مدلهای پیش گویی کامپیوتری عنصری کلیدی در سامانه زیستی^{۴۷} هستند. تمرکز این نرم افزار بر ایجاد الگوریتم ها، پایگاههای داده، و ابزارهایی برای تفسیر و دست یابی به اطلاعات ژنومیک بصورت آنالیز سیستماتیک می باشد.

فعالیت های Diana Lab، آنالیز بیان از طریق داده های deep sequencing، تفسیر عناصر تنظیمی و اهداف miRNA برای یافتن احتمال نقش miRNA ها در ایجاد بیماریهای مختلف است. پروژه های در حال انجام این گروه شامل پیش گویی اهداف miRNA، آنالیز داده های مربوط به بیان و بررسی عملکرد miRNA.

⁴⁷ System Biology

دخیل نمودن miRNA ها در مسیرهای بیولوژیک می باشد. در این سایت از نتایج و داده های TarBase 5.0 که شامل بیش از ۱۳۰۰ هدف اثبات شده تجربی است، استفاده می گردد. همچنین این پایگاه داده به چندین پایگاه مشهور دیگر مانند HUGO, Ensembl, UCSC, SwissProt متصل می باشد.

۳-۳-تهیه سازه ژنی مورد نیاز

۳-۳-۱-استخراج DNA از بافت موش و تکثیر ژن miRNA

استخراج DNA ژنومیک مورد نیاز از سلولهای کبد موش با استفاده از کیت QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germany) انجام شد. برای ژن مذکور از روی ژنوم سلول PCR انجام شد. پرایمرهای طراحی شده برای PCR این قطعات دارای بازوهای اضافی هستند که در آنها توالیهای آنزیمهای اندونوکلاز BamHI و XbaI تعبیه شد به طوریکه در بالادست پرایمر سنس توالی شناسایی آنزیم BamHI و در پایین دست پرایمر آنتی سنس جایگاه شناسایی آنزیم XbaI قرار گرفت.

۳-۳-۲-کلون کردن miRNA در وکتور T/A

۳-۳-۱-طراحی پرایمر و انجام PCR

پرایمر قطعه ای کوچک از مولکول DNA تک رشته ای می باشد که این توالی الیگونوکلوئوتیدی مکمل قسمتی از مولکول DNA الگو است. اولین قدم در PCR، طراحی یک جفت پرایمر مناسب می باشد. برای تکثیر هر قطعه مورد نظر از هر مولکول DNA هدف نیاز به یک جفت پرایمر متفاوت است. اگر توالی DNA مشخص باشد، طراحی پرایمر برای هر قطعه مورد نظر از آن مولکول DNA امکان پذیر است. نرم افزارهای کامپیوتری می توانند کمک زیادی در طراحی پرایمر کنند. در این پژوهش از نرم افزارهای AlleleID 6 و oligoanalyzer به منظور طراحی پرایمر برای ژن های مورد مطالعه استفاده شد. برای این منظور ابتدا سکانس ژن های مورد نظر از NCBI گرفته شد و سپس به کمک نرم افزارهای فوق پرایمرهای مناسب برای این ژن ها تهیه گردید. برای

تمایز mRNAها از ژنهای مادر لازم بود که پرایمرها در تقاطع اگزونی طراحی گردد. از سویی دیگر چون اکثر پرایمرهای طراحی شده برای واکنش Real Time PCR استفاده می‌شد، لذا طوری این پرایمرها تنظیم شد که طول محصولات PCR کوتاه‌تر از ۲۰۰ نوکلئوتید شود.

شرایط ایتیمم در فرایند PCR در جدول ۲-۳ آورده شده اند.

جدول ۲-۳: مقادیر مورد استفاده جهت انجام PCR قطعه حاوی ژن miR-135

حجم (μl)	اجزا تشکیل دهنده
۰/۷	Forward Primer (20 pmol)
۰/۷	Reverse Primer (20 pmol)
۱	dNTP (10 mM)
۲/۵	10X PCR buffer
100 ng/	DNA Template
۰/۵	Pfu DNA polymerase
تا حجم ۲۵	ddH ₂ O

جدول ۳-۳: برنامه سیکل‌های واکنش PCR

مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
Enzyme activation	۹۵° C	۲ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵° C	۲۰ ثانیه	۳۵
Annealing	۵۵° C	۲۵ ثانیه	
Extention	۷۲° C	۶۰ ثانیه	
Final Extention	۷۲° C	۷ دقیقه	۱

سپس PCR برای قطعه ژنومی به طول 248 جفت باز (miR-135) با آنزیم Pfu DNA Polymerase انجام شد. توالی پرایمرها در جدول ۴-۱ آمده است.

۳-۲-۲-آشکارسازی محصولات روی ژل و تخلیص از ژل

قطعات بدست آمده بر روی ژل ۲٪ الکتروفورز شدند. بعد از اتمام الکتروفورز، قطعه تکثیر یافته مورد نظر با توجه به اندازه با دقت از روی ژل بریده شده تا کمترین مقدار آگاروز همراه محصول PCR جدا شود. سپس با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (QIAquick Gel Extraction)، DNA خالص بدست آمد. شرایط تخلیص از ژل به شرح زیر است:

در مرحله اول باید سعی کنیم با یک اسکالپل تیز باند DNA مربوط را برداریم. سپس قطعه ژل مورد نظر را وزن می‌کنیم و ۳ برابر وزن ژل به آن بافر QG اضافه می‌کنیم. لازم به ذکر است که هر ۱۰۰ μl ~ ۱۰۰ mg در نظر می‌گیریم [حداکثر ظرفیت ستونهای این کیت یک قطعه ژل ۴۰۰ mg است].

برای مدت ۱۰ دقیقه میکروتیوب حاوی ژل و بافر را روی Hot plate در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم، بهتر است هر ۲-۳ دقیقه میکروتیوب را خارج کرده و ورتکس کنیم تا کاملاً مخلوط شده و ژل حل گردد. بعد از اینکه کاملاً ژل در بافر حل شد باید محلول زرد رنگ باشد، یعنی به همان رنگ اولیه بافر [اگر رنگ محلول نارنجی یا بنفش شد باید ده میکرولیتر از سدیم استات سه مولار با pH=۵ به آن اضافه کنیم تا رنگ به زرد تغییر پیدا کند]. در این مرحله باید برابر یک حجم معادل ژل به آن ایزوپروپانول اضافه کنیم، لازم به ذکر است که این مرحله برای قطعات کوچکتر از ۵۰۰ bp و بزرگتر از ۴۰۰۰ bp است، ایزوپروپانول بر روی قطعات بین این دو اندازه هیچ تاثیری ندارد.

در این مرحله یک ستون استخراج کیت را در یک میکروتیوب ۲ ml قرار می‌دهیم. سپس ژل حل شده در بافر را روی ستون ریخته و یک دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌کنیم، ظرفیت نهایی هر ستون ۸۰۰ μl است و برای مقادیر بیش از این، دفعات را زیاد می‌کنیم. به منظور خروج کلیه مواد به غیر از DNA از ستون ۵ ml بافر QG روی ستون ریخته و یک دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌کنیم. به منظور شستشوی

نهایی ۰/۷۵ ml از بافر PE به ستون اضافه کرده و یک دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌کنیم. میکروتیوبی را که ستون در داخل آن قرار گرفته کاملاً از بافر تخلیه کرده و سپس یک دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌کنیم. در این مرحله ستون را در یک میکروتیوب ۱/۵ ml استریل که عاری از آنزیم‌های DNase و RNase می‌باشد قرار می‌دهیم. در این مرحله برای شستشوی DNA از فیلتر ستون ۵۰ µl از بافر EB را به مرکز فیلتر ستون اضافه کرده و سپس ستون را برای مدت یک تا دو دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار داده و پس از آن به مدت یک دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌کنیم. برای اطمینان از تخلیه کامل ستون مرحله قبلی را می‌توانیم با ۳۰ µl از بافر EB تکرار کنیم. محصول نهایی در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود.

غلظت DNA های تخلیص شده با دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. برای تعیین غلظت نمونه، جذب نوری محصول در طول موجهای ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود که به ترتیب بیانگر غلظت DNA، پروتئین و آلودگی با فنل می‌باشد. برای تعیین خلوص DNA از محاسبه نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ استفاده می‌شود، به طوری که حصول نسبت ۱/۸-۲ نشانگر خلوص DNA می‌باشد. با توجه به این نکته که جذب ۲۶۰ برابر یک، معادل ۵۰ µg DNA/ml است فرمول:

$$\text{غلظت} (\mu\text{g/ml}) = \text{A}_{260} \times \text{ضریب رقت}$$

غلظت نمونه تعیین می‌گردد.

محصول بدست آمده از تخلیص دوباره بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید تا از کیفیت تخلیص هم اطمینان حاصل شود. سپس از محصول بدست آمده برای کلون کردن قطعات حاصل استفاده شد.

سپس محصول این مرحله مجدداً روی ژل برده شد. پس از اتمام الکتروفورز، قطعه تکثیر یافته مورد نظر با توجه به اندازه با دقت از روی ژل بریده شده تا کمترین مقدار آگاروز همراه محصول PCR جدا شود. سپس با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل، DNA خالص بدست آمد.

غلظت DNA های تخلیص شده با دستگاه بیوفتومتر بررسی شد و محصول بدست آمده از تخلیص دوباره بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید تا از کیفیت تخلیص هم اطمینان حاصل شود. پس از محصول بدست آمده برای کلون کردن در وکتور T/A استفاده شد.

۳-۳-۲- اتصال وکتور T/A به قطعه تخلیص شده

اتصال قطعات (ligation) با وکتور T/A مطابق شرایط جدول ۲-۵ انجام شد. تیوپها و نوک سمپلرها باید عاری از نوکلئاز باشند.

جدول ۳-۴: اجزای مورد نیاز برای واکنش اتصال

حجم (μl)	اجزا تشکیل دهنده
۱۱/۴ μg	DNA (Template) تخلیص شده
10ng/۳	Plasmid T/A
۳	10 X Ligation Buffer
۱	T4 DNA Ligase , 5U
تا ۳۰	ddH ₂ O
تیوب در دمای C ۲۲° بصورت Overnight نگهداری می شود	

۳-۳-۲-۴- مستعد نمودن باکتری با روش شیمیایی و ترانسفورماسیون

پس برای انجام واکنش ترانسفورماسیون، از باکتری E.coli سویه DH5α استفاده شد و قطعات واکنش اتصال miRNA به وکتور در این باکتری به روش شیمیایی ترانسفورم شد. شرایط تهیه سلول مستعد set up شده در مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته به شرح زیر است:

- ۱- از باکتری E. coli سویه DH5α (استوک موجود در ۷۰- درجه سانتی گراد) کشت اولیه در محیط LB Broth داده، یک شب با حرکت ۲۵۰ دور در دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.
 - ۲- روز بعد از آن تلقیح مجدد در لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر LB broth شد و در انکوباتور شیکردار بمدت ۳-۴ ساعت انکوبه شد تا زمانی که کدورت به دانسیته نوری حدود ۰/۵-۰/۴ برسد که با دستگاه بیوفتومتر بررسی شد.
 - ۳- باکتری در سانتریفوژ یخچالدار ۵۰۰۰rpm بمدت ۱۰ دقیقه در ۴درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید.
 - ۴- محیط رویی خارج شده و سلولها بر روی یخ در ۱ میلی لیتر 0.1 M CaCl₂ سرد به آرامی سوسپانسیون شدند.
 - ۵- قرار دادن روی یخ بمدت ۲۰-۳۰ دقیقه
 - ۶- رسوب سلولها با سانتریفوژ ۵۰۰۰rpm بمدت ۳ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد
 - ۷- سوسپانسیون مجدد رسوب باکتریها در ۷۰۰ میکرولیتر 0.1 M CaCl₂ سرد و قرار دادن روی یخ بمدت ۲۰-۳۰ دقیقه
 - ۸- رسوب سلولها با سانتریفوژ در ۵۰۰۰ rpm بمدت ۳ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد
 - ۹- سوسپانسیون مجدد رسوب باکتریها در ۳۰۰ میکرولیتر CaCl₂ سرد و قرار دادن روی یخ بمدت ۲۰-۳۰ دقیقه. (در صورتی که بخواهیم استوک از باکتری مستعد شده تهیه کنیم در این مرحله ۳۰۰ میکرولیتر را در دو لوله میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر هر یک ۱۵۰ میکرولیتر الیکوت کرده و به هر یک ۱۵۰ میکرولیتر گلیسرل ۱۰٪ اضافه کرده، سریعاً به ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل می شود).
- در مرحله بعد مرحله ترانسفورماسیون سلولها با وکتور به شرح زیر انجام شد:
- ۱- تقسیم ۳۰۰ میکرولیتر در دو لوله میکروتیوب هریک حاوی ۱۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری مستعد روی یخ
 - ۲- اضافه نمودن ۲۰۰ نانوگرم (۲۰-۱۰ میکرولیتر) از محصول اتصال به یکی از تیوبهای سوسپانسیون باکتری (لوله دیگر بعنوان کنترل منفی نگهداری شد)
 - ۳- قرار دادن روی یخ بمدت ۳۰ دقیقه

- ۴- قرار دادن تیوب در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد بمدت ۹۰ ثانیه
- ۵- به سرعت انتقال به روی یخ بمدت ۲ دقیقه
- ۶- اضافه نمودن ۱ میلی لیتر محیط LB Broth فاقد آنتی بیوتیک به هر یک از لوله ها و انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در ۳۷ درجه بمدت ۱ ساعت
- ۷- انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به محیط LB Agar حاوی آنتی بیوتیک مناسب با فاکتور مقاومت وکتور (۱۰۰ µg/ml آنتی بیوتیک آمپی سیلین برای وکتور T/A) و سانتریفوژ باقی مانده سوسپانسیون در ۱۰۰۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه.
- ۸- سوسپانسیون مجدد رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر محیط مایع و کشت آن در پلیت مشابه. لوله کنترل منفی نیز روی یک پلیت کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۱۶-۱۸ ساعت کشت شد.
- روز بعد پلیت‌ها از لحاظ وجود کلونی باکتری بررسی شدند که پلیت مربوط به کنترل منفی عاری از هر نوع کلونی باکتری و تأیید کننده دقت کار بود.

۳-۲-۵- انجام واکنش کلونی PCR برای تأیید ورود وکتور T/A حاوی قطعات به باکتری

واکنش PCR بر روی هر یک از کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط جامد LB (آنتی بیوتیک دار) به منظور تأیید ورود قطعات به وکتور در باکتری E. coli، طبق جدول ۳-۵ و ۳-۶ گذاشته شد:

جدول ۳-۵: اجزای لازم جهت انجام واکنش کلونی PCR

حجم (µl)	اجزا تشکیل دهنده
۱۲/۵	Master Mix 2X
۱	Reverse Primer (10pmol)

Forward Primer(10pmol)	۱
Taq DNA Polymerase	۰/۴
Template	حجمی معادل تماس سر سمپلر با کلونی مورد نظر
ddH ₂ O	تا ۲۵

جدول ۳-۶: سیکل‌های واکنش کلونی PCR

مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
Enzyme activation	۹۵° C	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵° C	۲۰ ثانیه	۳۵
Annealing	۵۵° C	۲۵ ثانیه	
Extention	۷۲° C	۶۰ ثانیه	
Final Extention	۷۲° C	۷ دقیقه	۱

۳-۲-۶- تخلیص پلاسمید از باکتری ترانسفورم شده

تخلیص پلاسمید به منظور تأیید قطعات ترانسفورم شده در باکتری باکیت استخراج پلاسمید انجام شد.

این سیستم بر اساس لیز قلیایی باکتری و اتصال پلاسمید به غشاء سیلیکاژل استوار است. دستور العمل

تخلیص پلاسمید بر اساس پروتوکول کیت به شرح زیر است :

۱- کشت شبانه باکتری به حجم ۱۰ میلی لیتر در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد.

- ۲- پس از خارج نمودن محیط کشت بصورت کامل، رسوب باکتریها در ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوسپانسیون مجدد حل شده و به یک میکروتیوپ منتقل شد.
- ۳- ۲۰۰ میکرولیتر محلول لیزکننده به میکروتیوپ اضافه شده و ۴-۶ بار به آرامی بر گردانده شد تا بخوبی مخلوط شود.
- ۴- میکروتیوپ بمدت حداکثر ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.
- ۵- ۴۰۰ میکرولیتر محلول خنثی کننده به میکروتیوپ افزوده شده و ۶-۱۰ بار به آرامی بر گردانده شد تا بخوبی مخلوط شود.
- ۶- در ۹۰۰۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد.
- ۷- مایع رویی به آرامی به ستون تخلیص پلاسمید منتقل شده، سپس در ۱۳۰۰۰ rpm بمدت ۶۰ ثانیه سانتریفوژ شده و مایع خارج شده دور ریخته شد.
- ۸- به ستون ۷۰۰ میکرولیتر الکل ۸۰٪ اضافه شده مانند مرحله قبل سانتریفوژ انجام شد.
- ۹- ستون بمدت ۱ دقیقه جهت خارج شدن کامل الکل سانتریفوژ شد.
- ۱۰- مقدار ۵۰ میکرولیتر بافر EB به ستون اضافه شده و بمدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پلاسمید تخلیص شده در مایع خارج شده قرار داشت.

۳-۲-۷- آشکار سازی محصولات استخراج شده (پلاسمید) با الکتروفورز روی ژل آگارز

غلظت پلاسمید های استخراج شده با دستگاه اسپکترو فوتومتر بررسی شده و سپس بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید تا از کیفیت تخلیص هم اطمینان حاصل شود.

۳-۲-۸- تهیه نمونه های ذخیره از باکتریهای ترانسفورم شده مثبت

یک کلونی از باکتری که بر روی پلیت رشد کرده و اثبات ترانسفورم شدنش با واکنش کلونی PCR احراز شده بود، برداشته و در ۵ میلی لیتر محیط مایع LB حاوی ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ آنتی بیوتیک (آمپی سیلین) برده و ۱۶-۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با شیک انکوبه شد. بعد از زمان انکوباسیون محیط را در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ کرده، به رسوب حاصل ۷۵۰ میکرولیتر محیط LB و

۲۵۰ میکرولیتر گلیسرول ۶۰٪ (استریل) افزوده و به سرعت ورتکس شد و تیوب حاصل در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

۳-۳-۱- کلون کردن miRNA در وکتور pCDH

کلون کردن قطعه حاوی miRNA در ناحیه پس از GFP با استفاده از آنزیمهای XbaI/BamHI انجام شد. این قطعات باید به وکتور pCDH وارد می شدند. بنابراین کشت باکتری حاوی این وکتور در محیط مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (مقاومت آنتی بیوتیکی وکتور) انجام شد. پس از ۱۸ ساعت رشد باکتری تخلیص پلاسمید بوسیله کیت تخلیص پلاسمید صورت گرفت. ابتدا غلظت پلاسمید های استخراج شده با دستگاه بیوفتومتر بررسی شده و سپس بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید تا از کیفیت تخلیص هم اطمینان حاصل شود. پلاسمید T/A حاوی miRNA بوسیله آنزیم های XbaI/BamHI هضم آنزیمی شد و اتصال قطعه miRNA و وکتور جدید با استفاده از آنزیم لیگاز انجام شد.

جدول ۳-۷: اجزای مورد نیاز برای واکنش اتصال

اجزا تشکیل دهنده	حجم (μl)
DNA (miRNA) تخلیص شده	۶
Plasmid pCDH	10ng/۱/۵
10X Ligation Buffer	۲
T4 DNA Ligase , 5U	۱/۵
ddH ₂ O	تا ۲۰
تیوب در دمای ۲۲°C بصورت Overnight نگهداری می شود	

روز بعد سویه Stbl4 باکتری E. coli (که احتمال نو ترکیبی در آن بسیار پائین تر است) با روش کلرید کلسیم (که قبلاً توضیح داده شد) مستعد گردید و با محصول اتصال pCDH:miRNA ترانسفورم شد. شاخص مقاومت آنتی بیوتیکی این وکتور آمپی سیلین می باشد که در محیط جامد LB حاوی این آنتی بیوتیک ، کشت باکتری ترانسفورم شده انجام شد.

۳-۳-۲- انجام واکنش کلونی PCR برای تأیید ورود قطعات به وکتور

واکنش PCR بر روی هر یک از کلونیهای رشد کرده بر روی محیط LB (حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین) به منظور تأیید ورود وکتور حاوی هر یک از قطعات به باکتری، طبق جدول زیر انجام شد.

جدول ۳-۸: سیکلهای واکنش کلونی PCR

مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل
Enzyme activation	۹۵° C	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵° C	۲۰ ثانیه	۳۵
Annealing	۵۵° C	۲۵ ثانیه	
Extention	۷۲° C	۶۰ ثانیه	
Final Extention	۷۲° C	۷ دقیقه	۱

۳-۳-۳- تخلیص پلاسمید از باکتری ترانسفورم شده و آشکار سازی محصولات استخراج شده

(پلاسمید) با آگاروز ژل الکتروفورز

تخلیص پلاسمید به منظور فرستادن قطعات مورد نظر برای sequencing و تأیید قطعات ترانسفورم شده در باکتری انجام شد. ابتدا غلظت پلاسمید های استخراج شده را با دستگاه بیوفتومتر بررسی شده و سپس بر روی

ژل آگاروز الکتروفورز گردید تا از کیفیت تخلیص هم اطمینان حاصل شود. سپس حدود ۳۰ میکرولیتر از پلاسمید های تخلیص شده به همراه پرایمرهای اختصاصی تعیین توالی گردید.

۳-۳-۴- بررسی نتایج بدست آمده از توالی یابی

توالی های بدست آمده با توالی ثبت شده در GenBank با شماره دسترسی MIMAT0000147 با بکارگیری نرم افزار Mega4 مقایسه شد تا از اختصاصی بودن آنها اطمینان حاصل آید و کلونی هایی که توالی صحیح داشتند در ۷۰- درجه سانتی گراد در محیط LB مایع حاوی ۶۰٪ گلیسرول ذخیره شدند.

۳-۳-۵- تهیه نمونه های ذخیره از باکتری های ترانسفورم شده مثبت

یک کلونی از باکتری که بر روی پلیت رشد کرده و اثبات ترانسفورم شدنش با واکنش کلونی PCR احراز شده بود، برداشته و در ۵ میلی لیتر محیط مایع LB حاوی ۱۰۰ μg/ml آنتی بیوتیک (آمپی سیلین) برده و ۱۶-۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با شیک انکوبه شد. بعد از زمان انکوباسیون محیط را در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ کرده، به رسوب حاصل ۷۵۰ میکرولیتر محیط LB و ۲۵۰ میکرولیتر گلیسرول ۶۰٪ (استریل) افزوده و به سرعت ورتکس شد و تیوب حاصل در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

۳-۴- کشت سلول یوکاریوت

۳-۴-۱- لاین سلولی

در این آزمایش از سلول C2C12 جهت ترانسفکشن بهره گرفتیم. این لاین سلولی از سلول های عضله اسکلتی پای موش مشتق می شوند. مورفولوژی سلول های اپیتلیال را دارند و از بهترین رده های سلولی برای بررسی عوامل دخیل در بیماری های دیابت محسوب می شوند (۷۲).

۳-۴-۱-۱- پاساژ یاخته های منجمد و ذوب کردن سلول^{۴۸}

مواد و وسایل مورد نیاز

- محیط کشت DMEM
- سرم FBS-
- بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد
- لوله های مخروطی در پیچدار استریل ۱۵ میلی لیتری
- پیپت پاستور
- سانتریفوژ

پس از خارج کردن کرایوتیوب از تانک ازت مراحل زیر انجام شد:

سلول ها را سریعاً از ازت خارج کرده در دمای مناسب (37°C یا 27°C) قرار داده می شوند تا ذوب گردند. سپس محتویات لوله انجماد در داخل لوله استریل ریخته شده در ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای 25°C سانتریفوژ می شوند، تا غلظت مواد سمی کاهش یابد. پس از سانتریفوژ رسوب سلول را با محیط کشت سلول به صورت تعلیق در آورده به فلاسک کشت یاخته انتقال داده شده در انکوباتور CO_2 دار 37°C قرار داده می شود. بعد از اتصال سلول ها به بستر سلولی لازم است تعویض محیط انجام گردد.

۳-۴-۱-۲- شمارش سلولی

برای تعیین تعداد سلول های زنده در شرایط استریل ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقت ۱/۲۰ سلولی را برداشته و با استفاده از لام نئوبار، سلول های زنده شمارش شدند.

⁴⁸. Tawing

۳-۴-۱-۳- کشت مجدد سلول

پس از پرشدن کامل سطح بستر کشت سلول و تشکیل تک لایه کامل از سلول ها، در کنار شعله یا زیر هود بیولوژیک محیط کشت را خارج کرده، به وسیله بافر فسفات استریل یا محیط کشت فاقد سرم یاخته ها را شستشو داده، سپس در صورت نیاز از تریپسین یا تریپسین-ورسن برای کندن یاخته ها از سطح بستر استفاده می شود. بلافاصله بعد از آغاز جدا شدن یاخته ها از سطح بستر ظرف کشت سلول، تریپسین-ورسن را خارج ساخته و با افزودن محیط کشت یاخته و با آسپیراسیون سلول ها، سوسپانسیون یکنواختی از آنها در محیط کشت بدست می آید. بعد از یکنواخت شدن تعلیق سلولی ۲۰۰ میکرولیتر از تعلیق را برای شمارش سلولی در داخل لوله استریل قرار داده و بقیه در ظروف مناسب کشت داده می شود. سلول های کشت داده شده به انکوباتور ۳۷^{0c} (برای اکثر سلول ها) انتقال داده می شوند. برای دستیابی به کشت سلول مناسب لازم است تا در هر میلی لیتر از سوسپانسیون سلول که به ظروف کشت توزیع می شود ۱۰^۵×۱-۲ سلول وجود داشته باشد.

۳-۴-۱-۴- انجماد سلول ها^{۴۹}

مواد و وسایل مورد نیاز

- سرم ES-FBS
- محلول DMSO^{۵۰}
- کرایوپروال ۱/۵ سی سی
- فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد
- فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد
- یخچال
- رک
- تانک ازت

⁴⁹. Freezing

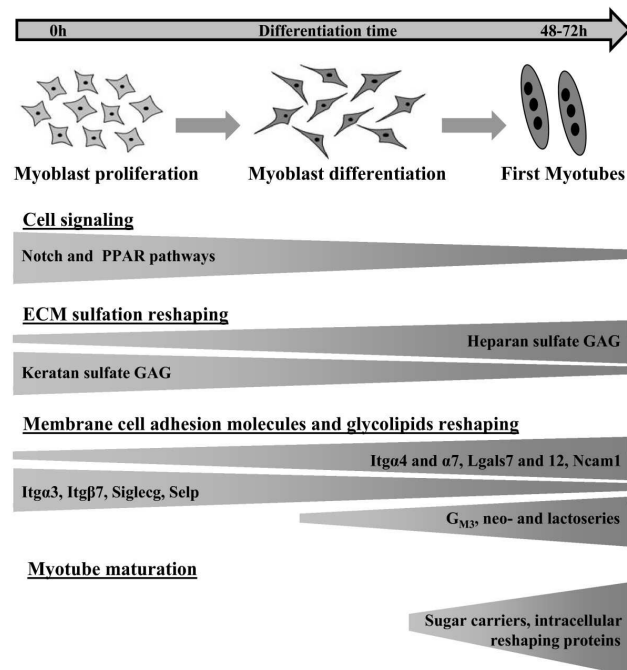
⁵⁰. Dimethylsulfoxide

• پیپت پاستور

حداقل یک ساعت قبل از انجماد، محیط کشت را با محیط کشت تازه عوض می شد. ابتدا محیط روی سلول ها را دور ریخته، در صورت نیاز آنها را تریپسینه کرده تا از بستر کشت رها شوند. برای انجماد باید حداقل 10^6 یاخته در یک میلی لیتر محیط نگهدارنده انجماد وجود داشته باشد تا تعداد سلول های زنده بعد از ذوب کردن برای استفاده مناسب باشد. بدین منظور به یک میلی لیتر از تعلیق سلول ها به میزان ۸۰ درصد سرم استریل جنین گاو و ۱۰ درصد DMSO اضافه می شد. برای حصول نتیجه مطلوب لازم است تا دمای سوسپانسیون یاخته ها را به آرامی تقلیل داده و در نهایت به سرمای لازم رسانده شد. در این بررسی سلولها به مدت یک تا دو ساعت در فریزر -20°C درجه سانتی گراد و به مدت شش الی ۲۴ ساعت در فریزر -70°C درجه سانتی گراد قرار گرفتند و پس از این زمان به تانک ازت منتقل شدند.

۳-۴-۲- تمایز سلول های C2C12

به منظور تمایز دادن سلولهای C2C12 از حالت پایه به حالت تمایز یافته ، پس از پرشدن $70-80\%$ سطح بستر کشت یاخته ، محیط کشت سلولی تعویض و از محیط DMEM حاوی 3% سرم اسب (محیط کشت تمایزی) استفاده گردید(شکل ۳-۳). سلولهای پایه به مدت ۷۲ ساعت با این در محیط نکوباتور 37°C گرماگذاری شدند . طی این دوره تمایزی هر ۲۴ ساعت تعویض محیط کشت تمایزی صورت گرفته است(۷۲،۷۳).



شکل ۳-۳- زمانبندی تمایز سلولهای عضلانی و میزان بیان ژنها (۷۳)

۳-۴-۱- ارزیابی تمایز سلول های C2C12 با تعیین بیان پروتئین های فاز تمایزی با استفاده از

تکنیک ایمنوسیتوشیمی

به منظور ارزیابی بیان پروتئین های مرحله پایه PAX 7 و تمایزی میوزین از تکنیک ایمنوسیتوشیمی (شرایط set up شده در مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته) استفاده گردید.

محلول های لازم:

فرمالدهید ۲٪،

آنتی بادی های اولیه

آنتی بادی ثانویه متصل به FITC (AF8035; RaziBioTech) DAPI (Invitrogen Cat. # D1306)

، PBS/FBS: PBS, pH 7.4 containing 10% FBS

Tritonx100/PBS/FBS: 0.3% Triton x100/PBS/FBS

لازم به ذکر است، قسمت Fab آنتی بادی اولیه برای آنتی ژن های مورد نظر اختصاصی است، قسمت Fc آن با Fc ایزوتیپ کنترل یکی است، این آنتی بادی برای نمونه تست استفاده می شود اما به نمونه کنترل منفی افزوده نمی شود. ایزوتیپ کنترل به نمونه کنترل منفی افزوده می شود، در حالیکه برای نمونه تست استفاده نمی شود، Fab ایزوتیپ کنترل اختصاصی نیست. آنتی بادی ثانویه به هر دو نمونه تست و کنترل منفی افزوده می شود.

مراحل زیر جهت انجام ایمنوسیتوشیمی انجام داده شد:

۲۴ ساعت قبل از آزمایش، و سلول ها را درون چاهک های پلیت ۱۲ خانه قرار می دهیم تا بر روی آنها چسبیده و گسترش یابند

محیط کشت سلولها را برداشته و ۱ml فرمالدهید ۲٪ روی آنها می ریزیم. اجازه می دهیم سلولها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شوند. فرمالدهید را برداشته و ۱ میلی لیتر PBS بر روی سلولها می ریزیم و اجازه می دهیم ۵ دقیقه بر روی سلولها بماند. مجددا این کار را تکرار می کنیم. سپس PBS را بر می داریم.

۱ میلی لیتر 0.3% Triton x100/PBS/FBS بر روی سلولها می ریزیم و اجازه می دهیم ۵ دقیقه بر روی سلولها باشد. ۱ میلی لیتر از PBS/FBS را بر روی سلولها ریخته و اجازه می دهیم ۱۰ تا ۲۰ دقیقه بماند تا جایگاه های غیر اختصاصی را برای رسوب آنتی بادی بلاک کند. آنتی بادی اولیه را در Tritonx100/PBS/FBS با رقت های مورد نظر رقیق می کنیم. کنترل را نیز که تنها حاوی Tritonx100/PBS/FBS می باشد را نیز آماده می کنیم.

محلولهای کنترل و آنتی بادی اولیه را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و با حداکثر دور سانتریفیوژ می کنیم.

۳۰۰ul از هر آنتی بادی اولیه را به هر چاهک اضافه می کنیم. انکوباسیون را می توان از یک ساعت تا یک شب (overnight) در ۴ درجه در نظر گرفت. چاهک سلول ها را سه بار، و هر بار با اضافه کردن PBS به

مدت ۵ دقیقه شستشو می دهیم تا آنتی بادی های نچسبیده شسته شوند. آنتی بادی ثانویه فلورسانت (FITC) را در محلول tritonx100/PBS/FBS رقیق میکنیم. سپس مانند مرحله سانتیفریوژ می کنیم.

۳۰۰ul از آنتی بادی ثانویه را به هر چاهک اضافه می کنیم. با فویل کاملاً چاهک ها را در برابر نور محافظت می کنیم. ۱ ساعت در دما اتاق قرار می دهیم چاهک ها را مانند مرحله قبل شستشو می دهیم و پس از آخرین شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر PBS بر روی نمونه ها می ریزیم.

۳-۴-۲-۲-۱ ایجاد حالت مقاومت به انسولین در سلول های C2C12

ابتدا سلول های C2C12 باید کشت داده شده و آماده شوند. برای رسیدن به فنوتیپ مقاومت به انسولین در گروه تست همزمان با تمایز سلولهای C2C12 از حالت پایه به حالت تمایز یافته، پس از پرشدن ۷۰-۸۰٪ سطح بستر کشت یاخته از محیط کشت های تمایزی حاوی ۱۰۰۰-۵۰۰-۱۰۰ nM انسولین استفاده گردید. سلولها به مدت ۷۲ ساعت با این در محیط انکوباتور ۳۷^{0c} گرماگذاری شدند. طی این دوره هر ۱۲ ساعت تعویض محیط کشت تمایزی صورت گرفته است (۷۴-۷۶).

گروه کنترل شامل سلولهایی بودند که در طی ۷۲ ساعت آزمایش تنها محیط کشت تمایزی را دریافت کرده بودند

۳-۵-۱-۱ ارزیابی میزان جذب قند

برای اثبات ایجاد حالت مقاومت به انسولین از روش ارزیابی غیر مستقیم قند مصرفی سلولها با استفاده از روش ارزیابی قند بر پایه هگزوکیناز به روش زیر استفاده شد. (۷۷-۸۰).

پس از اتمام مرحله ایجاد حالت مقاومت به انسولین، در روز آزمایش در ابتدا سلولها به مدت ۲ ساعت با محیط بدون گلوکز و سرم انکوبه شدند سپس محیط سلولها با محیط آزمون شامل محیط DMEM حاوی گلوکز ۵ mM به همراه ۱ μM انسولین آزمون و عدم حضور سرم به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷^{0c} گرماگذاری

شدند. سپس محیط روی سلولها جمع آوری شده و میزان قند موجود در محیط توسط کیت cobas integra

3. glucose HK Gen اندازه گیری شد

عدد به دست آمده از میزان قرائت شده مربوط به محیط کنترل کسر گردیده و عدد حاصل میزان جذب شده قند توسط سلولها در حضور انسولین و در مدت زمان سه ساعت را اشکار ساخت.

گروه اول : گروه تست سلولهایی بودند که مراحل ایجاد فنوتیپ مقاومت به انسولین (IRC) را به همراه مراحل تمایز سلولی گذرانده بودند. در خلال فرایند ارزیابی میزان جذب قند از محیط آزمون استفاده شد .

گروه دوم: گروه کنترل سالم سلولهایی بودند که تنها مراحل تمایز سلولی را گذرانده بودند. سلولها به دو دسته آزمون و کنترل تقسیم شده و تنها در مورد گروه کنترل مثبت (PCC) در خلال فرایند ارزیابی میزان جذب قند از محیط آزمون استفاده شد. سلولهای کنترل منفی (NCC) این دسته تنها محیط DMEM حاوی گلوکز ۵ mM را دریافت نمودند.

جدول ۳-۹- گروه بندی سلولها در آزمون ارزیابی جذب قند

افزودن انسولین آزمون طی ارزیابی میزان جذب قند	100nM انسولین طی مراحل تمایزی	گروه سلولی
خیر	خیر	نرمال و کنترل منفی NCC
بله	خیر	نرمال و کنترل مثبت PCC
بله	بله	مقاوم به انسولین IRC

۳-۶-۱. ترانسفکشن سلول یوکاریوت

۳-۶-۱-۱-آآماده سازی سلول ها جهت ترانسفکشن

ابتدا سلول های یوکاریوت باید کشت داده شده و آماده شوند. تقریباً ۲۴ ساعت قبل از ترانسفورماسیون سلول ها با پلاسمید حدود ۵ میلیون سلول C2C12 را در یک فلاسک ۱۰۰ میلیتری کشت می دهیم. محیط کشت مورد استفاده DMEM به همراه ۱۰٪ FBS ، L-Glutamine 2mM و Pen-Strep 1X می باشد. سپس سلول ها در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه قرار می گیرند تا تقریباً ۹۰٪ کف پلیت را بپوشانند (معمولاً یک شب کافی است). پس از آماده شدن سلول ها حدود دو ساعت قبل از ترانسفورماسیون محیط کشت روی سلول ها را با محیط تازه که به دمای ۳۷ درجه رسیده عوض می کنیم. در این مرحله سلول ها برای ترانسفورماسیون آماده اند.

۳-۶-۱-۲-ترانسفکشن به روش لیپوفکتامین

ماده شیمیایی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به منظور ترانسفکشن اسیدهای نوکلئیک به داخل سلول های یوکاریوت تهیه شده است. (۸۱-۸۲) مرحله انجام کار در یک پلیت ۲۴ خانه به شرح زیر بود:

سلول ها قبل از ترانسفکشن باید به تراکم ۸۰٪ رسیده باشند. محیط کشت سلول ها با ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM تازه بدون آنتی بیوتیک و سرم تعویض شد. میزان ۰/۸ میکروگرم از پلاسمید خالص شده با ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM بدون سرم و آنتی بیوتیک مخلوط شد و به آرامی تکان داده شد.

۲ میکرولیتر از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ با ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM بدون سرم و آنتی بیوتیک مخلوط شد و به آرامی تکان داده شد. و برای ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. مخلوط DNA و لیپوفکتامین با هم به طور کامل مخلوط شدند. برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. مخلوط فوق به حجم ۱۰۰ میکرولیتر به سلول ها اضافه شد.

۶ ساعت پس از ترانسفکشن محیط کشت سلولی تعویض شد و محیط تازه سرم دار جایگزین شد. تعویض محیط تا ۳ روز هر ۲۴ ساعت انجام میگردد

۷-۳- بررسی بیان ژن های هدف توسط Real-Time PCR

پس از کشت سلولهای C2C12 در سه حالت تمایز نیافته، تمایز یافته و ترنسفکت شده و تهیه حداقل یک فلاسک 75cm با تراکم ۱۰۰٪، جدا کردن همه RNA سلولی که شامل miRNA ها نیز می شود، انجام شد.

۳-۷-۱- استخراج Total RNA

برای استخراج Total RNA از سلول از کیت های گوناگونی استفاده می شود. این کیت ها براساس اختلاف فاز فنل- کلروفرم یا بر اساس قدرت تفکیک ستون های کوچک جداسازی کار می کنند. گرچه کیت های براساس فنل- کلروفرم دارای میزان تخلیص بالاتری هستند ولی RNA تخلیص شده با ستون سالم تر می باشد. تمامی سرسمپلرها (تیپ ها) و میکروتیوپ های مورد استفاده باید از نوع RNase- DNase free بوده و همه مراحل سانتریفوژ باید در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شود.

مواد مورد نیاز به این شرح می باشد: RNX-Plus (CinnaGen, Iran)، کلروفرم، اتانول ۱۰۰٪، اتانول ۷۰٪، آب استریل یا بافر رقیق کننده RNA (RNase - free)

مراحل کار به شرح زیر می باشد:

سلول های تریپسینه، در دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و محیط رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل در PBS حل شده و مجدد در همان شرایط سانتریفوژ و محیط رویی خارج شد. یک میلی لیتر RNX-Plus سرد به سلولهای رسوب کرده اضافه شده و خوب مخلوط شد. سپس سوسپانسیون وارد یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر گردید. اگر در این مرحله کلامپ سلولی ایجاد شد باید بمدت ۱ دقیقه ورتکس شود. بعد از ورتکس این مخلوط ۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد.

۲۰ میکرولیتر کلروفرم به محتویات میکروتیوب اضافه کرده و یک دقیقه بشدت تکان داده شد. سپس ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سانتریفوژ ۴ درجه سانتی گراد، ۲۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ انجام شد. جداسازی محلول رویی (فاز آبی) و انتقال آن به میکروتیوب جدید صورت گرفت.

هم حجم فاز آبی (محلول رویی) به آن اتانول ۱۰۰٪ سرد اضافه گردید. سپس به آرامی مخلوط کرده و بصورت Overnight در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. سانتریفوژ ۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ و دور ریختن محلول رویی (رسوب سفیدرنگی دیده می شود) انجام شد. یک میلی لیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه و ورتکس کرده تا رسوب از ته لوله کنده شود.

سانتریفوژ ۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ صورت گرفت. محلول رویی دور ریخته شد و درب لوله ۱۰ دقیقه باز ماند تا RNA رسوب کرده خشک شود. حدود ۳۰-۵۰ میکرولیتر آب RNase-DNase free اضافه گردید و نهایتاً محلول حاصل، جهت نگهداری به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

غلظت RNA استخراج شده تعیین شده و نیمی از آن برای بررسی mRNA و بیان ژن و نیمی دیگر برای بررسی miRNA مورد استفاده قرار گرفت.

برای آنالیز نتایج و بررسی بیان ژنها و miRNA نیاز به وجود سلول طبیعی برای مقایسه می باشد. در مورد دیابت نوع دو سلول C2C12 تمایز یافته به عنوان کنترل نرمال استفاده می شود.

۳-۷-۲- کنترل کیفیت RNA استخراج شده

برای کنترل کیفیت استخراج ابتدا ۵ میکرولیتر از RNA ی استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ که در شرایط RNase free تهیه شده بود الکتروفورز گردید. سالم بودن باند های RNA ریبوزومی و قدرت آنها نشانگر قدرت استخراج و سالم بودن RNA ی مورد نظر است .

نکته دیگری که در استخراج RNA حائز اهمیت است، میزان پروتئینی است که به همراه آن استخراج می شود. برای تعیین آلودگی های پروتئینی و غیره، ۲ میکرولیتر از محصول استخراج را به حجم ۱۰۰ میکرولیتر

رسانده و جذب آن در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد که نسبت میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ در بهترین حالت باید برابر با ۲ باشد. هرچه این میزان کمتر از ۲ باشد مبین بالا بودن آلودگی پروتئین و نامناسب بودن استخراج است.

با توجه به این نکته که $A_{260}=1$ معادل $40 \mu\text{g RNA/ml}$ است و با بکارگیری فرمول:

$$X \mu\text{g/ml RNA} = \text{ضرب رقت} \times A_{260} \text{ شده گیری اندازه}$$

غلظت RNA بدست آمد.

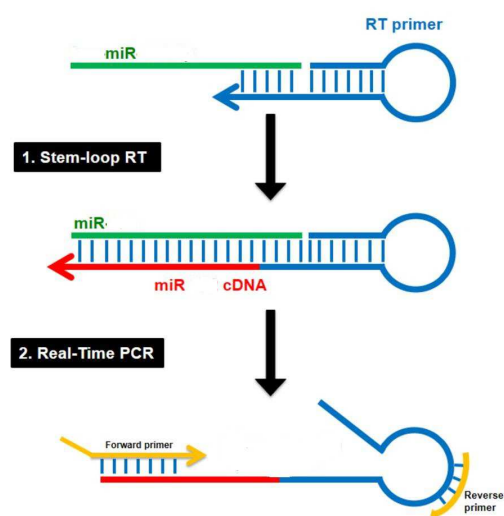
۳-۷-۳-انجام واکنش RT-PCR

برای تشخیص ترانسکریپت تولید شده توسط ژن miR-135 و ژن INSR از total RNA سلولهای ترانسفکت شده و سلولهای کنترل cDNA تهیه و با پرایمرهایی که اختصاصی طراحی بررسی ها انجام شد.

۳-۷-۳-۱-ساخت cDNA برای بررسی میزان بیان ژن ها

مراحل ساخت cDNA به شرح زیر انجام شد:

برای بررسی میزان بیان ژن INSR ۱ میکروگرم از RNA تخلیص شده در دو لوله ۲۰۰ میکرولیتر جداگانه، با ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر ۱۰ پیکومول random hexamer مخلوط گردیده و حجم در هر تیوب با آب RNase-DNase free به ۱۳ میکرولیتر رسانده شد. اما miR-135 ها توالی کوتاه ۱۹-۲۵ نوکلئوتیدی است که ردیابی آن با پرایمرهای معمول امکانپذیر نمی باشد. برای ردیابی آن از ساختاری بنام stem-loop استفاده شد (شکل ۳-۴). ساختار اولیه ساقه-لوپ از مقاله ای که در سال ۲۰۰۵ چاپ شده بود گرفته شد (۸۳) و با تغییراتی که در بخش روشها ذکر شد طراحی پرایمر لوپ-ساقه برای cDNA سازی، پرایمرهای سنس، آنتی سنس برای ردیابی miRNA ها انجام شد.



شکل ۳-۴- نحوه عملکرد پیرامر های stem loop در تکثیر miRNA

درب لوله ها را بسته و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در ترموسایکلر گذاشته میشود. سپس لوله ها فوراً بر روی یخ گذاشته شده و مواد زیرمطابق جدول ۳-۱۰ به آن افزوده شد

جدول ۳-۱۰: مواد مورد نیاز برای واکنش ساخت cDNA

حجم (μl)	اجزا تشکیل دهنده
۴	5X Buffer (Fermentas)
۲	dNTP(10mM)
۱	Reverse transcriptase(Fermentas)

سپس درب لوله را بسته و طبق پروتکل دمایی جدول ۳-۱۱ در ترموسایکلر گذاشته شد.

جدول ۳-۱۱: شرایط دمایی واکنش ساخت cDNA

زمان	دما
۱۰ دقیقه	۲۵ درجه سانتیگراد
۱۰ دقیقه	۳۷ درجه سانتیگراد
۴۵ دقیقه	۴۲ درجه سانتیگراد
۱۰ دقیقه	۷۵ درجه سانتیگراد (برای غیرفعال کردن آنزیم)

۳-۷-۴-انجام واکنش Real-Time PCR برای بررسی بیان ژنها

کلیه واکنش‌های Real Time PCR برای بررسی ژن‌های INSR و miR-135 در دستگاه Rotorgen 6000 (corbet) انجام گرفت. نحوه ساخت مستر میکس و برنامه دمایی واکنش در جدول ۲-۱۳ و ۲-۱۴ ذکر شده است.

جهت بررسی کمی بیان ژن هدف از سیستم Real-Time PCR به صورت نسبی^{۵۱} استفاده شد. برای این منظور لازم بود تست‌هایی برای بهینه سازی در غلظت پرایمرهای مورد استفاده در واکنش انجام بگیرد. از ژن β actin بعنوان ژن رفرانس برای نرمال کردن نتایج Real-Time PCR ژن مورد نظر استفاده شد.

واکنش Real-Time PCR طبق جداول زیر انجام شد.

⁵¹ Relative Quantification

جدول ۳-۱۲: اجزای لازم برای واکنش Real-Time PCR در دستگاه Rotorgen 6000 (corbet)

حجم (μl)	اجزا تشکیل دهنده
۱۲/۵	Master Mix(2X Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Fermentas)
۰/۴	Forward Primer (10pmol)
۰/۴	Reverse Primer (10pmol)
۲	Template (cDNA)
تا حجم ۲۵	diH ₂ O

جدول ۳-۱۳: برنامه زمانی مراحل واکنش Real-Time PCR ژن ها

مرحله	دما	زمان	سیکل
Enzyme activation	۹۵° C	۱۰ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴° C	۱۰ ثانیه	۴۰
Annealing and Extention	۶۰° C	۴۰ ثانیه	
قرائت نشر فلورسانس توسط دستگاه در انتهای مرحله طویل شدن در کانال FAM/SYBER بود.			

بلافاصله بعد از انجام واکنش PCR برنامه Melt (طبق جدول ۳-۱۴) بر روی نمونه ها انجام شد.

جدول ۳-۱۴: برنامه زمانی Melting

مراحل	دمای اولیه	دمای انتهایی
شیب حرارتی	۶۵° C	۹۵° C
افزایش حرارتی	۰/۲ درجه سانتی گراد برای هر دفعه افزایش حرارت	
زمان توقف	۱ دقیقه برای اولین افزایش حرارت	
	۰/۵ ثانیه برای دفعات بعدی	
قرائت طیف نشری	جمع آوری طیف نشری فلورسانس حاصل از SG از کانال FAM/SYBER	

پس از آنالیز منحنی ذوب، در نهایت نتایج بصورت سیکل آستانه^{۵۲} گزارش شد و برای بررسی بیان ژنها از برنامه REST^{۵۳} استفاده شد.

جدول ۳-۱۵: برنامه زمانی مراحل واکنش Real-Time qPCR برای miRNA

مرحله	دما	زمان	سیکل
Enzyme activation	۹۵° C	۱۰ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴° C	۱۰ ثانیه	۴۵
Annealing and Extention	۶۰° C	۴۰ ثانیه	

پس از آنالیز منحنی ذوب، در نهایت نتایج بصورت سیکل آستانه^{۵۴} گزارش شد و برای بررسی بیان ژنها از برنامه REST استفاده شد.

⁵² Cycle Threshold (C_T)

⁵³ Relative Expression Software Tool

⁵⁴ Cycle Threshold (C_T)

۳-۷-۴-۱- بررسی بیان mRNA های فاز پایه و تمایزی در سلولهای C2C12 جهت اثبات حالت

تمایزی با روش Real-Time PCR

به منظور بررسی ایجاد حالت تمایز یافته در سلولهای C2C12 بعد از استخراج RNA از سلولهای فوق در حالت پایه و تمایز یافته و سنتز cDNA توسط پرایمر رندم هگزامر از پرایمر اختصاصی Pax 7 به عنوان نشانگر حالت پایه و پرایمر اختصاصی myoD به عنوان نشانگر حالت تمایزی در واکنش real time PCR استفاده گردید شد (۷۲،۸۴،۸۵) و ارزیابی کمی به روش نسبی با بکارگیری نرم افزار REST صورت گرفت. از ژن نگهدارنده b actin بعنوان کنترل برای نرمال کردن نتایج استفاده شد.

۳-۷-۴-۲- بررسی بیان miRNA در رده سلولی با روش Real-Time PCR

واکنش Real-Time PCR برای ردیابی میزان بیان miRNA هدف در رده سلولی مورد نظر انجام شد و ارزیابی کمی به روش نسبی با بکارگیری نرم افزار REST صورت گرفت. از ژن SNORD47(U47) بعنوان rRNA با طول کوتاه بعنوان کنترل برای نرمال کردن نتایج استفاده شد.

بیان miR-135 در رده های سلولی تمایز یافته ترنسفکت شده با وکتور حاوی miR-135 با توجه به سلول نرمال تمایز یافته ترنسفکت شده با وکتور بدون miR بدست آمده و نتایج در برنامه REST آنالیز شد.

۳-۷-۴-۳- بررسی بیان ژن INSR در رده سلولی با روش Real-Time PCR

جهت بررسی کمی بیان ژن هدف از سیستم Real-Time PCR به صورت نسبی^{۵۵} استفاده شد. از ژن β actin بعنوان ژن رفرانس برای نرمال کردن نتایج Real-Time PCR ژن مورد نظر استفاده شد. توالی کلیه پرایمرهای استفاده شده در جدول مربوط به پرایمرها در قسمت های قبل آورده شده است.

بیان ژن INSR در رده های سلولی پایه ، تمایز یافته ترنسفکت شده با وکتور حاوی miR-135 با توجه به سلول نرمال تمایز یافته ترنسفکت شده با وکتور بدون miR بدست آمده و نتایج در برنامه REST آنالیز شد.

⁵⁵ Relative Quantification

۳-۷-۵- مقایسه نسبی بیان ژن‌ها

به طور اساسی دو روش برای تجزیه و تحلیل اطلاعات کمی در Real-time وجود دارد: روش مطلق و روش نسبی. بر اساس کاربرد و هدف از تجزیه و تحلیل، محقق تصمیم می‌گیرد که کدامیک از روش‌ها را انتخاب کند.

(۱) در روش مطلق، تجزیه و تحلیل نمونه‌های ناشناخته در مقایسه با منحنی استاندارد همان ژن که توسط همان دستگاه رسم شده است، صورت می‌گیرد.

(۲) روش نسبی برای بررسی تغییرات میزان بیان ژن در دو حالت مختلف به کار می‌رود. به این منظور Ct به دست آمده برای دو حالت برهم تقسیم می‌شود. نسبت به دست آمده بیانگر میزان افزایش یا کاهش بیان ژن در این دو حالت می‌باشد.

از آنجایی که کارایی مراحل تخلیص نمونه و رونوشت‌برداری معکوس برای دو دسته سلول در دو حالت مختلف یکسان نمی‌باشد، لازم است برای حذف این ناهمسانی، از یک ژن که بیان آن در سلول در هر شرایطی یکسان است به عنوان رفرانس استفاده کنیم. این ژن باید از خانواده ژن‌های خانه نگهدار^{۵۶} انتخاب شود. در این پژوهش کلیه آزمون‌ها به صورت نسبی مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت.

در این آزمون پرایمرهایی که برای ژن INSR طراحی شد در ناحیه تقاطع اگزونی آن‌ها قرار داشت و نتایج با β actin که یک ژن خانه نگهدار است نرمال گردید.

ژن نگهدارنده snord نیز به منظور نرمال سازی بیان ژن miR-135 استفاده شد.

۳-۷-۵-۱- آنالیز آماری

نتایج آنالیزهای Real-Time PCR با نرم‌افزار آماری REST 2009 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این نرم-افزار با نرمال کردن نتایج هر تست با کنترل داخلی همان تست، حاصل را در مقایسه گروه تیمار نسبت به

⁵⁶Housekeeping

کنترل شرکت می‌دهد. این نرم‌افزار با روش آزمون‌های تصادفی پی‌در پی گروه‌های تیمار و کنترل را با هم مقایسه می‌کند (۸۶).

۳-۷-۵-۲- آنالیز نتایج با REST

در روش $\Delta\Delta Ct$ کارایی PCR برای هر دو حالت و ژن خانه نگهدار، یکسان و ۱۰۰ درصد در نظر گرفته می‌شود؛ سپس با استفاده از فرمول ۲-۲ نسبت بیان ژن در دو حالت بررسی می‌شود.

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

نرم‌افزار REST 2009 یک الگوریتم مستقل است که به منظور آنالیز بیان ژن، نتایج خام حاصل از Real Time PCR را براساس تکنیک‌های محاسبات تصادفی^{۵۷} و خودراه‌انداز^{۵۸} مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌دهد. ضریب اطمینان^{۵۹} حاصل از این آزمون‌ها قادر است معناداری آماری آزمون را محاسبه کرده انحراف از معیار آن‌ها را نیز اگرچه در بعضی از موارد بزرگ می‌شود نشان دهد. نمودارهای ویشکر باکس^{۶۰} نتایج آنالیز هر ژن و پراکندگی این نتایج را نشان می‌دهند.

۳-۷-۶- آنالیز داده‌های خام microarray سه پژوهش ثبت شده و مقایسه نتایج آنها با نتایج این

پروژه

در راستای تایید یافته‌های ذکر شده از نتایج خام microarray منتشر شده با شماره ثبت شده GEO accession #GSE4694 ، GEO accession #GSE6798 و GEO accession # GSE26168 استفاده شده و با استفاده از آزمون paired t-test در نرم افزار spss آنالیز انجام پذیرفت.

⁵⁷ Randomization

⁵⁸ Bootstrapping

⁵⁹ Confidence interval

⁶⁰ Wishker Box plot

فصل چهارم

یافته ها و نتایج

۴-۱- نتایج بررسی های بیوانفورماتیک در مرحله پیش مطالعاتی

miRNA ها توالیهای نوکلئوتیدی کوچک به طول ۱۹-۲۵ نوکلئوتید هستند که در اکثر موارد با اتصال به ناحیه 3'UTR ژن هدف خود، مانع بیان آن شده و از این طریق در تنظیم بیان ژنها نقش دارند. این نقش در بیماریها از جمله سرطان بیشتر حائز اهمیت می باشد. در واقع یکی از کلیدیترین و اساسی ترین منطقه یک رونوشت ژنی، ناحیه 3'UTR آن است که محل اصلی برای تاثیر گذاری miRNA ها می باشد در این تحقیق سعی شد که تاثیر miRNA ها یی که مطالعات بیوانفورماتیک اتصال آنها به 3'UTR هدف را تائید و پیشگویی کرده بود بر ژنهای کلیدی مسیر سیگنالینگ انسولین و ایجاد حالت مقاومت به انسولین به عنوان مقدمه بروز بیماری دیابت نوع ۲ نقش دارد، مورد بررسی قرار گیرد. ژن INSR از جمله ژنهای کلیدی این مسیر هستند که برای این منظور انتخاب شدند. در گام اول با استفاده از الگوریتمهای miRDB, (Predicted miRNA, miRWalk موجود در برنامه Miranda, Diana-microT, TargetScan بخش sites on mRNA 3' UTR region produced by miRWalk and other programs) با اشتباه^{۶۱} و یا اتصال کامل miRNA ها با ژن INSR مورد بررسی بیوانفورماتیک قرار گرفت. نتایج وارد فایل Excel شد. از میان حجم بالای داده های بدست آمده غربالگری انجام شد و miRNA هایی که حداقل در سه نرم افزار و الگوریتم تائید شدند.

۴-۱-۱- هدف گیری ژن INSR با miR-135 در نرم افزار TargetScan

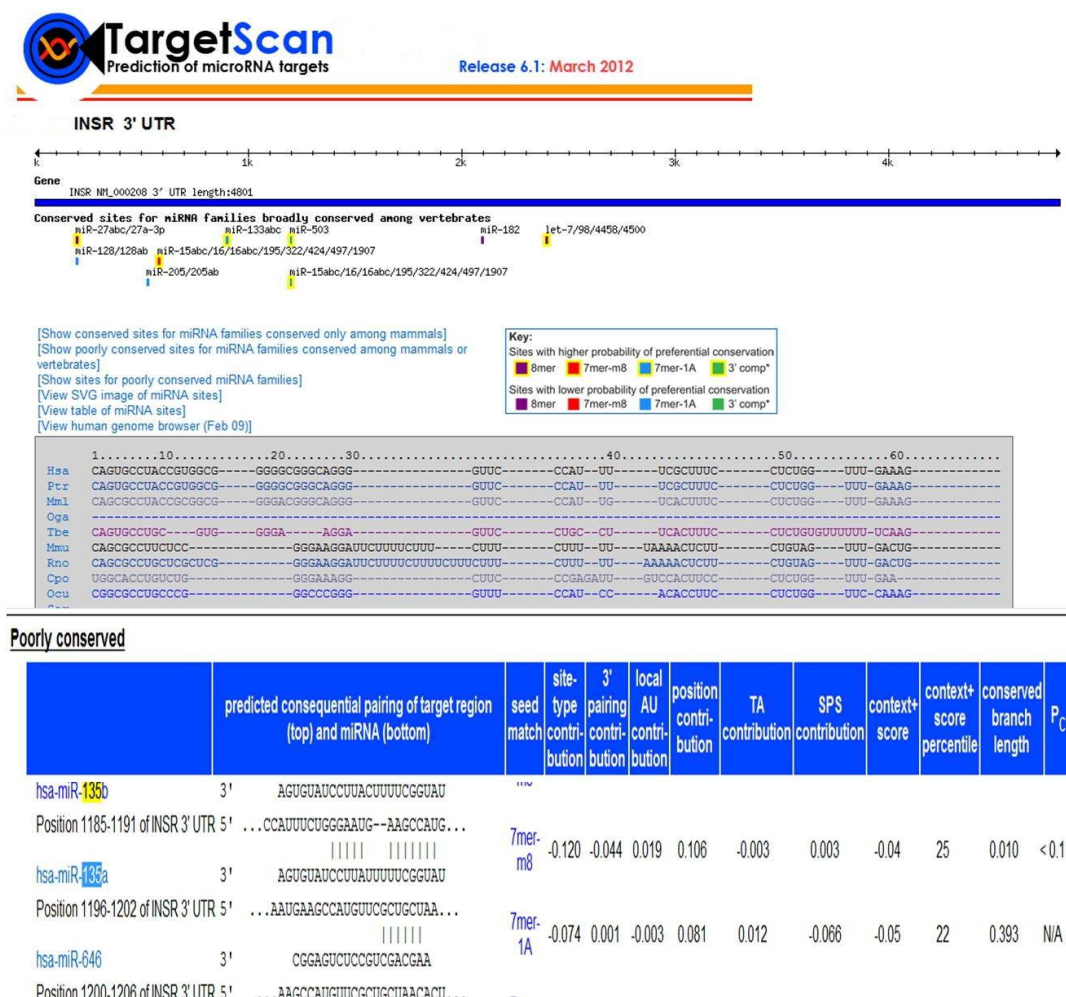
در این نرم افزار حداقل سید مورد قبول ۷ تایی است. به عبارتی دیگر سر 5' هر miRNA باید حداقل ۷ اتصال کامل با هدفش داشته باشد تا این نرم افزار این سایت را گزارش کند. محکمترین سایت توسط این الگوریتم دارای سید ۸ تایی است. سید ۷-مری A سیدی است که از نوکلئوتید ۱-۷ اتصال برقرار می شود در حالیکه در موقعیت نوکلئوتید ۱ اتصال، باز A قرار دارد. سید ۷-مری m8 سیدی است که از نوکلئوتید ۲-۸ اتصال برقرار است. در جدول ۳-۲ امتیاز هر سایت مشخص شده است.

⁶¹Mismatch

بهترین و دقیق ترین miRNA پیش بینی شده در یک موقعیت دارای پائین ترین total context score خواهد بود. نواحی دارای همپوشانی^{۶۲} از پیش بینی برداشته می شوند زیرا بصورت همزمان امکان بررسی همه شرایط امکانپذیر نمی باشد. همچنین پیشگویی براساس احتمال هدف گیری ناحیه حفاظت شده (preferentially conserved targeting) نیز مرتبه بندی می شود.

انتهای 3' هر ژن برای هدف گیری توسط miRNA بررسی شد.

شکل ۴-۱- نتایج هدف گیری ژن INSR با miR 135 با نرم افزار TargetScan



⁶²Overlapping

۴-۱-۲- هدف گیری ژن INSR با miR-135 در نرم افزار های دیگر

نرم افزار miRWalk حاوی موتور های جستجو گر قوی در نرم افزار های miRanda ، DIANA mT ، miRWalk و miRDB و کلیه نتایج پیش بینی توسط نرم افزار های ذکر شده را یکجا محاسبه می نماید .

الگوریتم بکار رفته در نرم افزار miRWalk براساس پیش بینی محل اتصال miRNA در توالی های کامل تمام ژنوم های شناخته شده (حتی میتوکندری) در موجودات مختلف است. با وارد کردن نام ژنهای مورد بررسی و آنالیز نتایج در بخش Predicted miRNA sites according to mRNA selected region صورت می گیرد. از این برنامه می توان بصورت معکوس نیز استفاده نمود یعنی با وارد کردن نام miRNA ، ژنهایی که توسط آن هدف گیری می شوند تعیین نمود. مقدار P value و تعداد نوکلئوتیدهای موجود در ناحیه سید برای امتیازدهی در این برنامه استفاده می شوند.

در برنامه miRanda هدف های پیش بینی شده miRNA بر اساس احتمال کاهش بیان mRNA با استفاده از یک مدل رگرسیون بنام مدل miRSVR می باشد. این مدل براساس توالی و خصوصیات زمینه ای دابلکس miRNA:mRNA رتبه بندی می شود. پروفایل بیانی miRNA در بافتهای مختلف از یک پروژه تعیین توالی کامل بافتهای مختلف پستانداران و رده های سلولی طبیعی و بیمار بدست آمده است. Phast Cons Score روشی از رتبه دهی براساس مدل Markov است که احتمال حفاظت شده بودن یک نوکلئوتید در توالی miRNA در طی تکامل را تخمین می زند که برای این کار از همردیفی چندگانه^{۶۳} استفاده می نماید که بین ۰-۱ است.

⁶³Multiple Alignment

جدول ۴-۱: نتایج هدف گیری ژن INSR توسط miR-135 در نرم افزار های miRWalk , Trgetscan ,

miRanda , DIANA mT و miRDB

MiRNA	Gene	DIANA mT	miRand a	miRWal k	miRDB	Trgetsca n	Sum
miR-135	INSR	1	1	1	0	1	4
let-7i	INSR	1	0	1	0	1	3
miR-202	INSR	1	0	1	0	1	3
miR-1207	INSR	0	1	0	0	1	2

نتایج حاصل نشان داد miR-135 از بین گروه miRNA های پیش بینی شده با هدف ژن INSR می تواند

کاندیدای مناسبتری برای بررسی پیام رسانی در مسیر ایجاد حالت مقاومت به انسولین باشد (جدول ۴-۱).

۴-۲- طراحی پرایمر ها

با توجه به موارد ذکر شده در بخش ۳-۳-۲-۱-۵- پرایمر های مورد نیاز کلونینگ و رد یابی زنجای مورد

نظر طراحی شدند.

جدول ۴-۲ : پرایمر های طراحی شده جهت انجام مراحل کلونینگ -miR-135

miR-135	PCR product: 248bp	
135-F-XbaI	GCTCTAGACTTCCCAGGACACATCAG	nt:19 tm:57.
135-R-BamHI	CGGGATCCGTGAGTCACTTGGCTTGG	nt:18 tm:57.6

جدول ۳-۴: توالی پرایمرهای طراحی شده برای ردیابی miRNA

توالی	اسم توالی
GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGC ATACGACTCACA	mmu-miR 135a RT
5'-CGATATGGCTTTTATTCCTA-	miR-135
5'-GAGCAGGGTCCGAGGT3'	R-universal

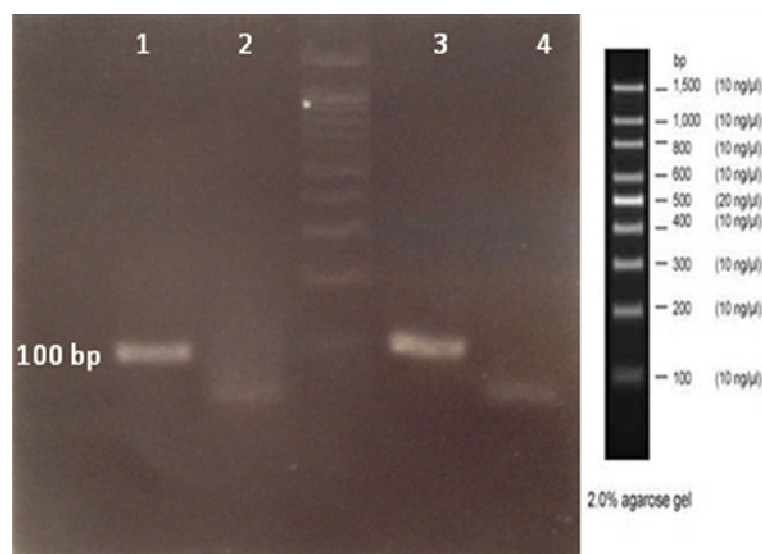
جدول ۴-۴: توالی پرایمرهای طراحی شده برای ردیابی INSR

پرایمر	ژن
Forward : 5` AACAGATGCCACTAATCCTTC 3`	INSR
Reverse :5` GCCCTTTGAGACAATAATCC 3`	

۴-۳-کلون کردن miR-135

۴-۳-۱-استخراج DNA و تایید آن با PCR β actin

مراحل استخراج DNA مطابق دستورالعمل کیت انجام شده و PCR تایید کننده صحت مراحل استخراج با استفاده از پرایمر های ژن β actin موشی انجام پذیرفت (شکل ۴-۲).

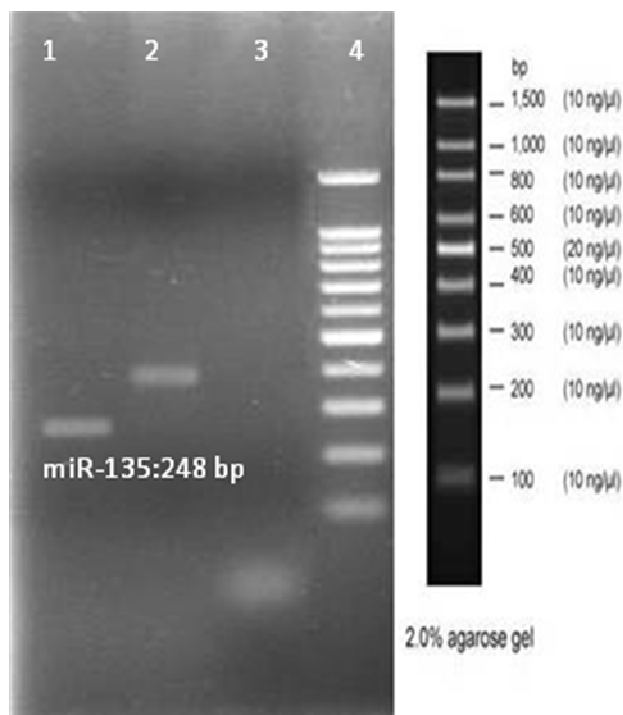


شکل ۴-۲ : استخراج DNA از بافت کبد موشی و انجام PCR با پرایمر کنترل β actin موشی جهت تایید مراحل استخراج. ردیف ۱ و ۳: حاوی نمونه DNA و ردیف ۲ و ۴: کنترل منفی

۴-۳-۲-کلون miR-135 در وکتور T/A

توالی DNA کد کننده هر miRNA از سایت NCBI گرفته شد و طراحی پرایمر و اعتبار بخشی آن با نرم افزارهای Allele ID6 و Oligo6 انجام شد. توالی مربوط به شناسایی و اثر دو آنزیم محدود کننده BamHI/XbaI در انتهای 5' پرایمرهای سنس و آنتی سنس قرار داده شدند. پرایمرها از لحاظ اتصال به نقاط دیگر ژنومیک انسان و سایر موجودات Blast شدند. نتایج نشان داد پرایمرها دارای اتصال اختصاصی به توالی miRNA خود هستند. PCR با آنزیم Pfu polymerase (که دارای خاصیت تصحیح خطا است) و

طبق شرایط ذکر شده در بخش روشها انجام شد. پس از انجام PCR، نتایج بر روی ژل الکتروفورز شدند (شکل ۴-۳).



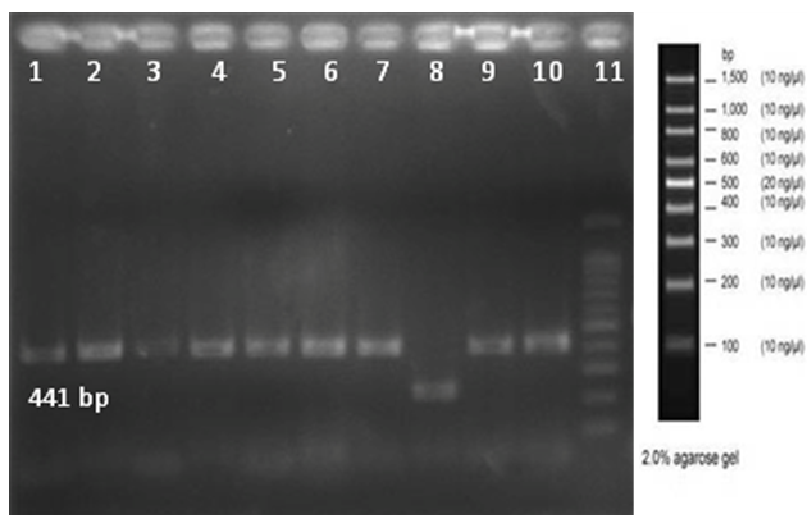
شکل ۴-۳: نتایج PCR برای کلون miR-135 با آنزیم Pfu polymerase. ردیف ۱: محصول PCR حاوی ژن miR-135. ردیف ۲: کنترل منفی PCR. ردیف ۳: ladder

طول قطعه مربوط به miR-135 ۲۴۸ جفت باز بود. در مرحله بعد، به محصول PCR نوکلئوتید A در انتهای ۳' مطابق دستورالعمل کیت کلونینگ T/A اضافه شد. کل محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز و تخلیص از ژل شد و سپس ۵ میکرولیتر مجدد بر روی ژل الکتروفورز شد تا غلظت محصول PCR تخلیص شده، بدست آید.

۴-۳-۳- وارد کردن قطعات به داخل وکتور T/A و تایید کلنی‌های T/A با روش colony PCR

برای بالا بردن کارایی فرایند کلون کردن ابتدا قطعات در وکتور T/A کلون وارد شد. پس از فرایند لیگاسیون سازه‌ها به داخل باکتری DH5 α ترانسفورم شد. سپس کلنی‌های به‌دست آمده با فرایند PCR کلونی غربالگری شدند. برای فرایند PCR کلونی قطعات حاوی miRNA از پرایمرهای F- M13/ -R universal استفاده شد (شکل ۴-۴).

اتصال وکتور T/A به قطعه miRNA با توجه به غلظت محصول PCR تخلیص شده و شرایط ذکر شده در مواد و روشها انجام شد. محصول اتصال برای ترانسفورم کردن باکتری مستعد شده با روش شیمیایی بکار برده شد و از کلونیهای ظاهر شده در محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک عامل مقاومت وکتور، کلونی PCR برای تأیید قطعه با پرایمرهای μ 13 (پرایمر سنس و آنتی سنس روی وکتور T/A) مورد نظر انجام شد که نتایج در شکل دیده می شود استفاده از پرایمر های F- M13/ -R universal موجب اضافه شدن ۱۹۷ نوکلئوتید به طول محصول قطعه کلون شده گشته و بنابراین قطعاتی بطول 441 جفت باز برای miR-135 حاصل می گردد (شکل ۴-۴).

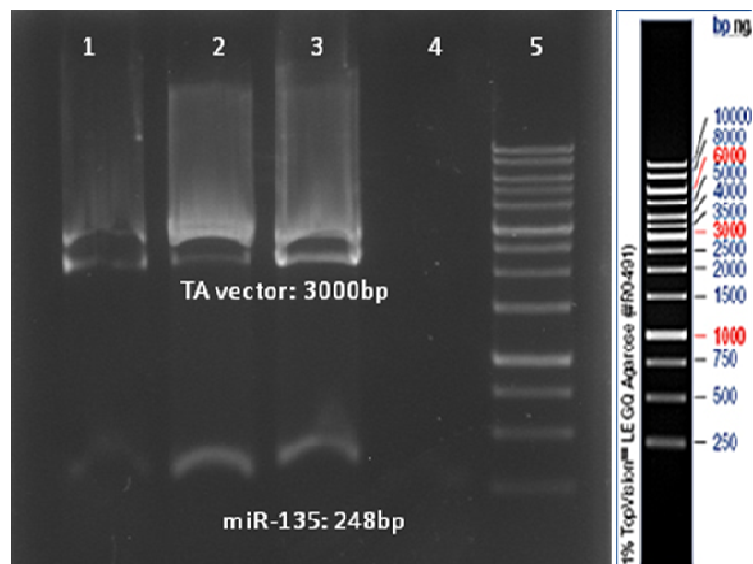


شکل ۴-۴: نتایج انجام واکنش Colony PCR با پرایمر های F- M13/-R universal برای تأیید ورود وکتور T/A حاوی miR-135 به باکتری. ردیف ۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۹ و ۱۰: کلنی مثبت حاوی وکتور ligate شده با miR-135. ردیف ۸: کلنی حاوی وکتور بدون miR-135. ردیف ۱۱: ladder

۴-۳-۴- تأیید کلنی های T/A با هضم آنزیمی وکتور T/A-vector-miR135 با XbaI/ BamHI

پلاسمید T/A-vector-miR-135 برای تأیید مجدد با دو آنزیم XbaI و BamHI هضم شد و مطابق شکل دو قطعه bp ۲۴۸ و bp ۳۱۰۰ تولید می گردد.

از تعدادی از کلونی هایی که PCR آنها قطعاتی با طول مطابق آنچه ذکر شد ایجاد نموده بودند کشت در محیط LB Broth انجام شد و پس از تخلیص پلاسمید باکتری، هضم آنزیمی با آنزیمهای BamHI/XbaI برای تأیید صورت گرفت (شکل ۴-۵).



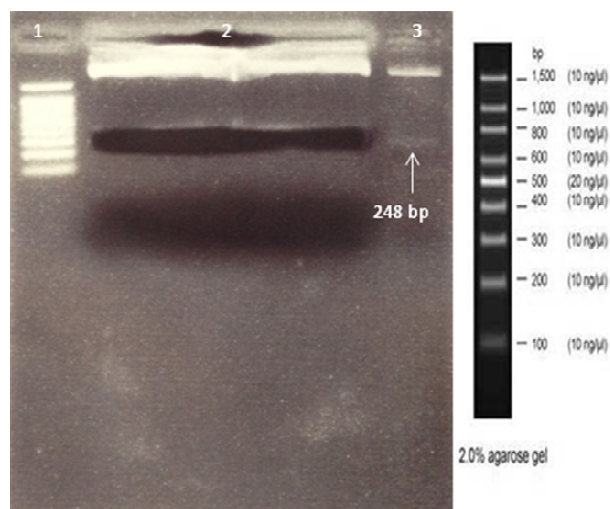
شکل ۴-۵: هضم وکتور T/A و خروج قطعه miR-135 با آنزیمهای BamHI/XbaI

ریف ۱ و ۳: وکتور T/A-miR-135 هضم شده. ردیف ۴: کنترل منفی استخراج. ردیف ۵: ladder.

۴-۴- ورود قطعه miR-135 به وکتور pCDH

۴-۴-۱- استخراج miR-135 از وکتور T/A به منظور وارد کردن قطعات به داخل وکتور pCDH

در مرحله بعد قطعه توالی miRNA باید از وکتور T/A خارج شده و وارد وکتور pCDH می شود. باکتری حاوی پلاسمیدهای تائید شده در محیط LB broth کشت شدند. تخلیص پلاسمید انجام شد و هضم آنزیمی با دو آنزیم فوق صورت گرفت (شکل ۴-۶).

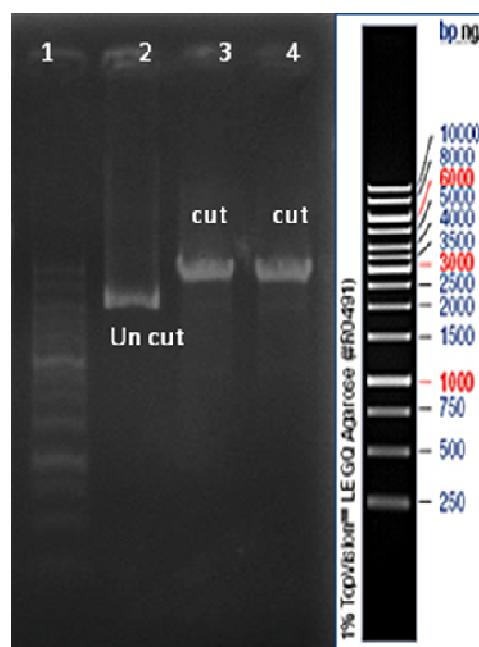


شکل ۴-۶: هضم وکتور T/A و خروج قطعه miR-135 با آنزیمهای BamHI/XbaI جهت اتصال به

پلاسمید pCDH. ردیف ۱: ladder. ریف ۳ و ۴: وکتور T/A-miR-135 هضم شده

۴-۴-۲- هضم وکتور pCDH با آنزیمهای BamHI/XbaI جهت اتصال miR-135 به وکتور

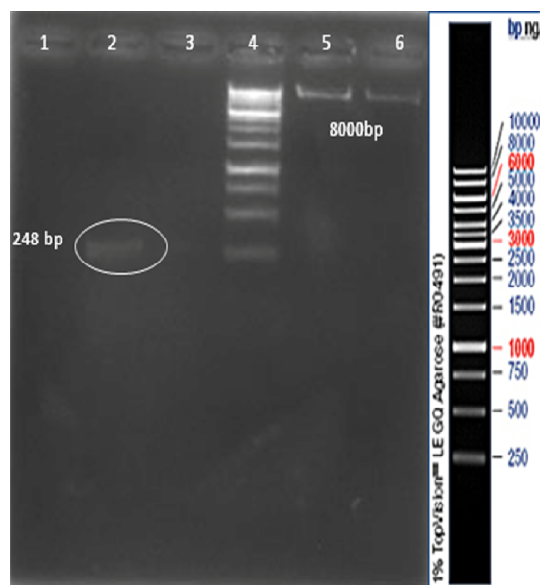
پس از تخلیص از ژل و واکنش اتصال قطعه با وکتور pCDH هضم شده توسط آنزیمهای BamHI/XbaI صورت گرفت (شکل ۷-۴).



شکل ۷-۴: هضم آنزیمی وکتور pCDH با آنزیمهای BamHI/XbaI پلاسمید برش و غیر برش

ردیف ۱: ladder. ردیف ۲: پلاسمید هضم نشده. ردیف ۳ و ۴: پلاسمید هضم شده

پس از تخلیص از ژل قطعه حاوی miR و وکتور (شکل ۴-۸) برش خورده ، اتصال وکتور pCDH به قطعه miRNA با توجه به غلظت محصول تخلیص شده و شرایط ذکر شده در مواد و روشها انجام شد.



شکل ۴-۸: وکتور pCDH هضم شده و miR-135 استخراج شده از وکتور T/A آماده اتصال

ردیف ۲: miR-135 استخراج شده از وکتور ردیف ۳: کنترل منفی استخراج. ردیف ۴: ladder. ردیف ۵ و ۶: وکتور pCDH هضم شده

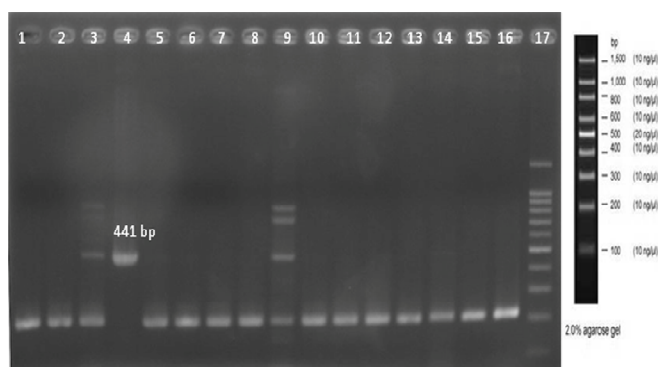
۴-۳-۴-۳-۴: وارد کردن قطعات به داخل وکتور pCDH و تایید کلنی‌های miR-135- pCDH با

روش colony PCR

مستعد نمودن باکتری با روش شیمیایی انجام شد و قطعه حاصل از اتصال برای ترانسفورم کردن باکتری به کار رفت. پس از کلونی PCR، کلونیهای مثبت روی پلیت کشت و استخراج پلاسمید شدند

از کلونیهای ظاهر شده در محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک عامل مقاومت وکتور، کلونی PCR برای تایید قطعه با پرایمرهای بدنه وکتور (پرایمر سنس روی پروموتور CMV و آنتی سنس روی پروموتور EF1 وکتور pCDH) مورد نظر انجام شد که نتایج در شکل دیده می شود استفاده از پرایمر های وکتور pCDH موجب

اضافه شدن ۱۹۷ نوکلئوتید به طول محصول قطعه کلون شده گشته و بنابراین قطعاتی بطول ۴۴۱ جفت باز برای miR-135 حاصل می گردد(شکل ۴-۹).



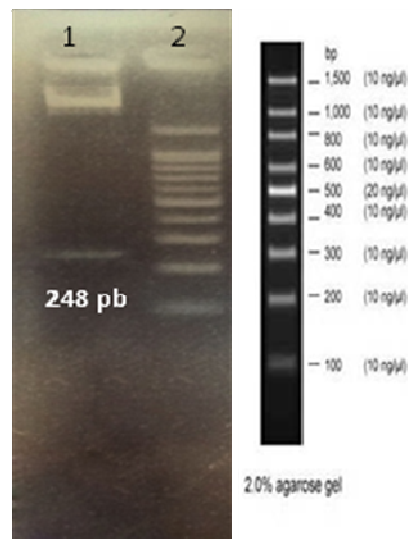
شکل ۴-۹: نتایج انجام واکنش Colony PCR برای تأیید ورود وکتور pCDH حاوی قطعات miR-135 به باکتری. تنها کلنی شماره ۲۹ حاوی ژن pCDH-miR-13 بود. ردیف ۴ : کلنی شماره ۲۹، ردیف ۱۷:

Ladder

۴-۴-۴- تایید سازه محتوی ژن pCDH-miR-135

۴-۴-۴-۱. تایید پلاسمیدهای pCDH-miR 135 با هضم آنزیمی و توالی یابی

پلاسمیدها از طریق هضم توسط آنزیمهای BamHI/XbaI تأیید شدند. مطابق شکل ۴-۱۰ دو قطعه bp۲۴۸ و bp۸۰۰ تولید می گردد.



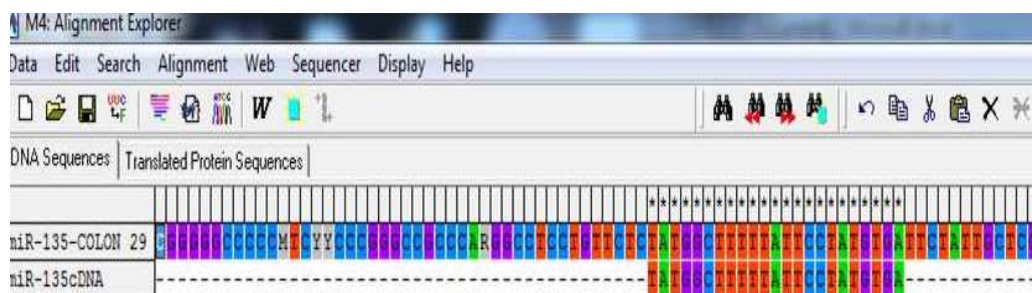
شکل ۴-۱۰: تائید کلون های miRNA از طریق هضم آنزیمی با با آنزیمهای BamHI/XbaI

ردیف ۱: miR135 و وکتور هضم شده pCDH، ردیف ۲: Ladder،

پس از تایید پلاسمیدها با هضم آنزیمی آن‌ها با پرایمرهای مخصوص توالی‌یابی (جدول ۴-۳)، جهت تعیین توالی به شرکت maqrogene کره جنوبی ارسال شدند و سپس با نرم افزار Mega4 توالی‌ها با هم انطباق داده شدند. نتایج توالی‌ها مبین امکان ادامه کار با پلاسمیدهای به دست آمده بود (شکل ۴-۱۱).

از کلونی مورد نظر به همراه پرایمرهایی که قبلاً برای تعیین توالی طراحی شده بودند برای تائید صحت توالی فرستاده شدند که نتایج آن برای یک کلون تائید شده از miR-135 به شرح زیر می باشد. کلونی باکتری حاوی پلاسمید miRNA مورد نظر کشت و در ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره

شدند.

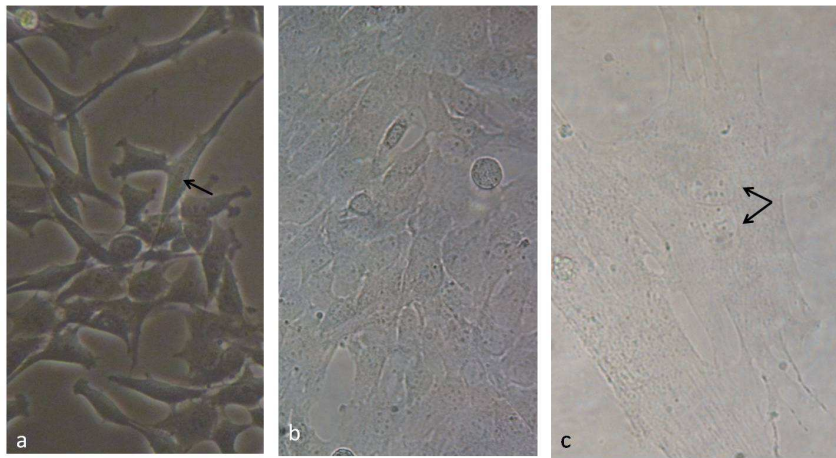


شکل ۴-۱۱: بررسی بدست آمده از توالی یابی miRNA کلون شده با توالی ژنومیک با نرم افزار Mega4.

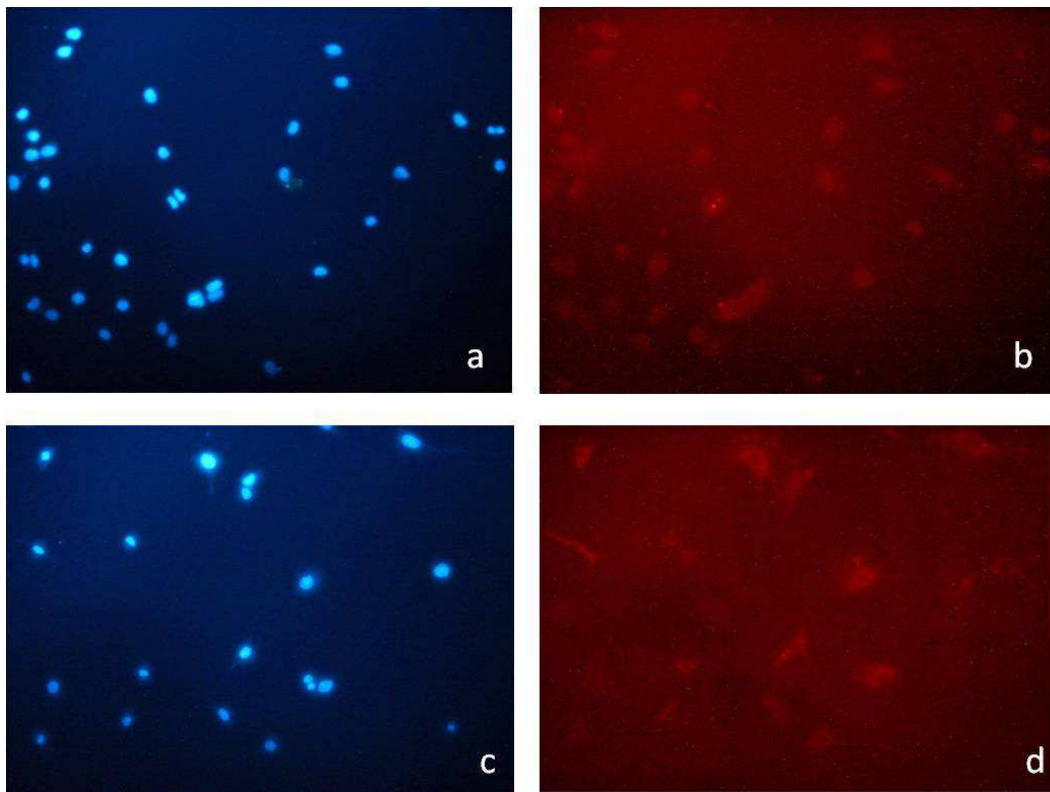
۴-۵- نتایج تایید تمایز سلولهای C2C12

۴-۵-۱- نتایج حاصل از ایمنوسیتوشیمی بر روی سلول های C2C12

ایمنو سیتوشیمی برای پروتئین pax 7 (فاکتور اختصاصی سلولهای تمایز نیافته) و پروتئین میوزین ((فاکتور اختصاصی سلولهای تمایز یافته) بر روی سلول های C2C12 موشی قبل و بعد از انجام فرایند القا تمایز انجام گرفته و بیان این پروتئین ها در فاز های مختلف تکامل سلولی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه نتایج کار در شکل زیر آورده شده است (اشکال ۴-۱۲ و ۴-۱۳).



شکل ۴-۱۲: مراحل تمایز سلولهای C2C12 از حالت پایه میوبلاستی a به حالت تمایز یافته b-c. در شکل c سلول دوهسته ایی تمایز یافته مشهود است.



شکل ۴-۱۳: ایمنوسیتوشیمی پروتئین pax 7 (فاکتور اختصاصی سلولهای تمایز نیافته) و پروتئین میوزین (فاکتور اختصاصی سلولهای تمایز یافته).

a و *b* به ترتیب نشان دهنده رنگ آمیزی *DAPI* و ایمونوسیتوشیمی پروتئین Pax 7 بر روی سلول های تمایز نیافته هستند. *c* و *d* به ترتیب نشان دهنده رنگ آمیزی *DAPI* و ایمونوسیتوشیمی میوزین بر روی سلول های موشی هستند که مراحل تمایز خود را طی نموده اند تمامی عکس های گرفته شده از سلول ها سه روز بعد از شروع تمایز گرفته شده است. محیط سلولهای تمایز نیافته حاوی محیط *DMEM* به همراه سرم ۱۰٪ *FBS* و محیط سلولهای تمایز یافته حاوی محیط *DME M* به همراه ۳٪ سرم اسب بوده است. عکسها دارای بزرگنمایی دویست برابر می باشند.

۴-۵-۲- ارزیابی بیان mRNA های فاز پایه و تمایزی در سلولهای C2C12 جهت اثبات حالت

تمایزی با روش Real-Time PCR

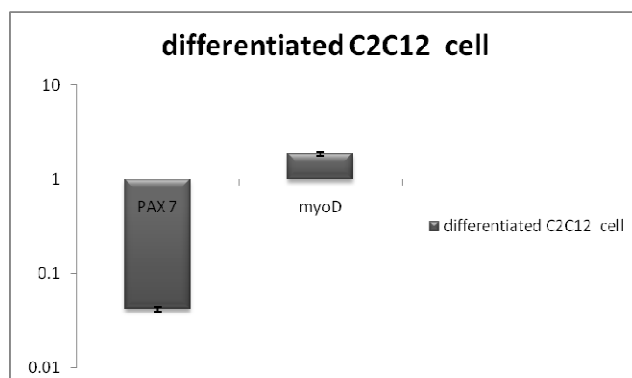
نتایج حاصل از آنالیز آماری انجام شده توسط نرم افزار REST در جدول زیر آمده است. نتایج حاکی از افزایش بیان ژن myoD و کاهش بیان ژن Pax7 در سلولهای تمایز یافته در مقایسه با سلولهای پایه میوبلاستی است.

جدول ۴-۵ : نتایج آنالیز آماری انجام شده توسط نرم افزار REST و ارزیابی بیان mRNA های ژن myoD و Pax فاز پایه و تمایزی در سلولهای C2C12

Gene	Type	Reaction efficiency	expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
actin β	REF	1.0	1.000				
Pax7	TRG	1.0	0.042	0.031-0.058	0.029-0.060	0.000	down
myoD	TRG	1.0	1.866	1.716-2.036	1.629-2.139	0.000	up

TRG - Target

REF - Reference



نمودار ۴-۱. نتایج Real Time PCR نسبی بیان ژنهای pax7 و myoD - پس از طی مراحل تمایزی. افزایش بیان ژن myoD و کاهش بیان ژن pax7 در حالت تمایز یافته در مقایسه با حالت پایه سلولها با $P \leq 0.05$ معنادار(*) است. در کلیه موارد میزان بیان ژن در سلولهای پایه معادل ۱ در نظر گرفته شده است

۴-۶- بیان ژن INSR در رده سلولی تمایز یافته در مقایسه با حالت تمایز نیافته در آنالیز با نرم

افزار REST

بررسی بیان ژن ها برای گروه های مختلف مورد مطالعه در شکل های زیر آورده شده است
تغییرات بیان بر اساس fold change و بر مبنای \log_{10} به نمایش در آمده است.

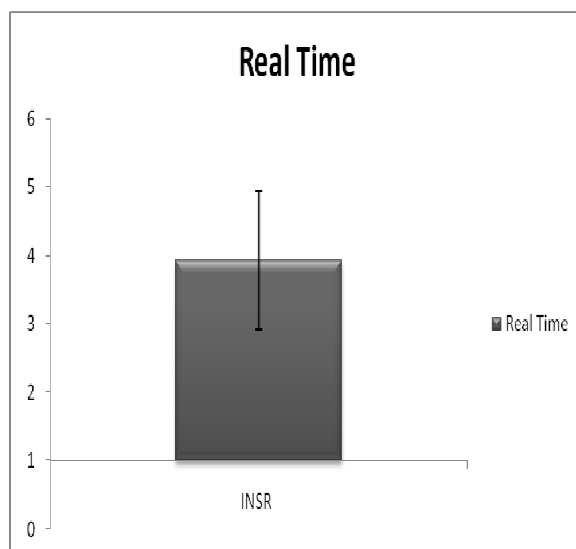
جدول ۴-۶ : نتایج آنالیز اماری انجام شده توسط نرم افزار REST و ارزیابی بیان ن ژن INSR در رده

سلولی تمایز یافته در مقایسه با حالت تمایز نیافت ت در سلولهای C2C12

Gene	Type	Reaction efficiency	expression	Std.Error	95% C.I.	P(H1)	Result
actin β	REF	1.0	1.000				
INSR	TRG	1.0	3.945	2.539 - 6.132	2.503 - 6.217	0.000	UP

TRG - Target

REF - Reference



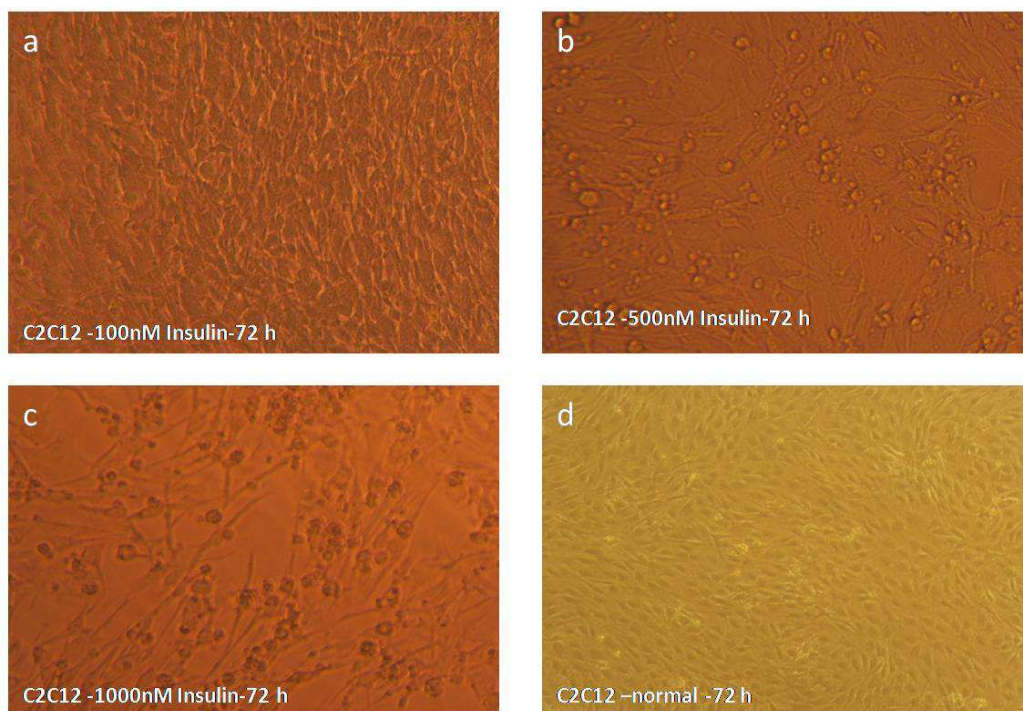
نمودار ۴-۲. نتایج Real Time PCR نسبی بیان ژن INSR - پس از طی مراحل تمایزی. افزایش بیان ژن INSR در حالت تمایز یافته در مقایسه با حالت پایه سلولها با $P \leq 0.05$ معنادار(*) است. میزان بیان ژن INSR در سلولهای پایه معادل ۱ در نظر گرفته شده است

۴-۷- به دست آوردن میزان مناسب انسولین مورد استفاده به منظور ایجاد حالت مقاومت به

انسولین

در این مرحله برای رسیدن به فنوتیپ مقاومت به انسولین در گروه تست همزمان با تمایز سلولهای C2C12 از حالت پایه به حالت تمایز یافته از محیط کشت تمایزی حاوی ۱۰۰۰ - ۵۰۰ - ۱۰۰ nM انسولین استفاده گردید. سلولها به مدت ۷۲ ساعت با این در محیط انکوباتور 37°C گرماگذاری شدند.

با توجه به اینکه سلولهای مقاوم شده بایستی از نظر ظاهر و تعداد با سلولهای نرمال یکسان باشند، غلظت ۱۰۰ nM انسولین انتخاب شد. زیرا غلظت بالاتر انسولین برای مدت ۷۲ ساعت سبب ایجاد تغییرات ظاهری و مرگ و میر سلولها می گردید.



شکل ۴-۱۴: به دست آوردن غلظت مناسب انسولین مورد استفاده در مرحله ایجاد مقاومت به انسولین در سلولهای *C2C12*. *a*: سلولهای تیمار شده با ۱۰۰ نانومولار انسولین به مدت ۷۲ ساعت. *b*: سلولهای تیمار شده با ۵۰۰ نانومولار انسولین به مدت ۷۲ ساعت. *c*: سلولهای تیمار شده با ۱۰۰۰ نانومولار انسولین به مدت ۷۲ ساعت. *d*: سلولهای نرمال و بدون تیمار به مدت ۷۲ ساعت

۴-۸- ارزیابی میزان جذب قند در سلولهای نرمال و سلولهای مقاوم به انسولین

در مرحله بعد به منظور ایجاد مدل فنوتیپ مقاومت به انسولین (IRC) سلولها به مدت ۷۲ ساعت در مجاورت محیط تمایزی حاوی ۱۰۰ نانومولار انسولین قرار گرفته (حالت شبیه سازی شده hyperinsulinemia) و میزان جذب قند سلول به صورت غیر مستقیم اندازه گیری شد.

جدول ۴-۷: نتایج ارزیابی میزان قند محیط مورد استفاده در آزمون جذب قند

Sample	-media mg/dl
media	105
media	104
media	104
mean	104

جدول ۴-۸: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای کنترل مثبت در آزمون جذب قند

3 h incubation with insulin	-media mg/dl	used-mg/dl
Normal-PCC	51	53
Normal -PCC	48	56
Normal -PCC	51	53
	mean	54

با توجه به محاسبات فوق سلولهای تمایز یافته کنترل مثبت PCC در اثر تحریک با انسولین آزمون به میزان 54mg/dl جذب قند را از خود نشان داده اند.

جدول ۴-۹: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای کنترل منفی در آزمون جذب قند

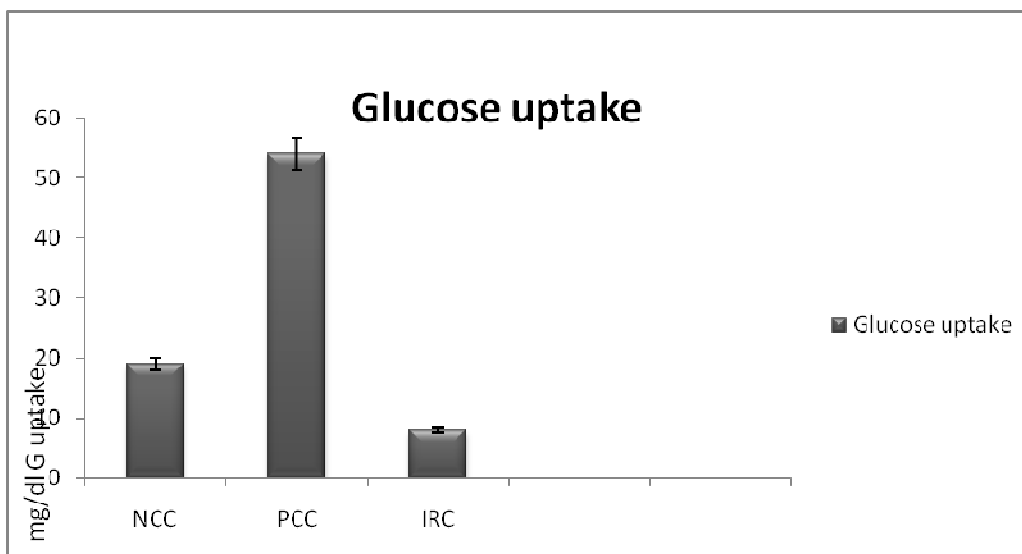
3 h incubation without insulin	-media mg/dl	used-mg/dl
Normal-NCC	84	20
Normal -NCC	87	17
Normal -NCC	84	20
	mean	19

با توجه به محاسبات فوق سلولهای تمایز یافته کنترل منفی NCC بدون تحریک با انسولین ازمون به میزان 19mg/dl جذب قند را از خود نشان داده اند.

جدول ۴-۱۰: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای مقاوم به انسولین در ازمون جذب قند

3 h incubation with insulin	mg/dl-media	used-mg/dl
100nM -IRC	96	8
100nM -IRC	93	11
100nM -IRC	99	5
	mean	8

با توجه به محاسبات فوق سلولهای تمایز یافته مقاوم به انسولین IRC در اثر تحریک با انسولین ازمون به میزان 8 mg/dl جذب قند را از خود نشان داده اند.



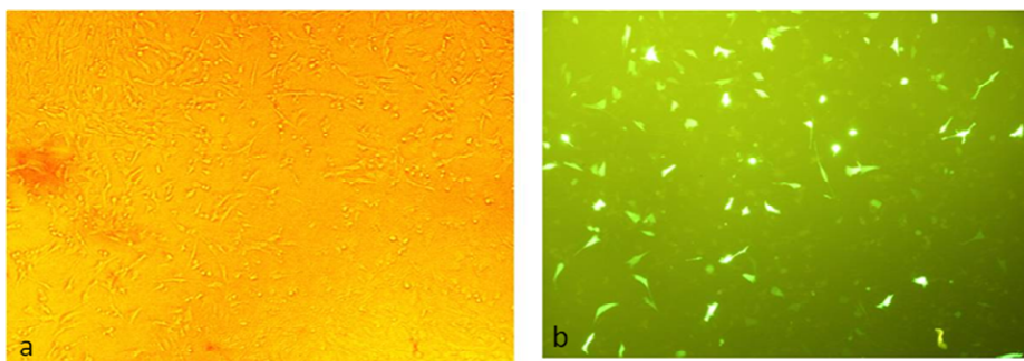
نمودار ۳-۴: نتایج ازمون جذب قند در حالات مختلف سلولهای C2C12 بر اساس mg/dl. کاهش معنا دار میزان جذب قند در سلولهای IRC در مقایسه با سلولهای PCC مشاهده می شود. ($p \leq 0.05$)

۴-۹- ترانسفکت سلولهای C2C12 با وکتور pCDH و انجام Real-Time PCR و ارزیابی اثر بیان

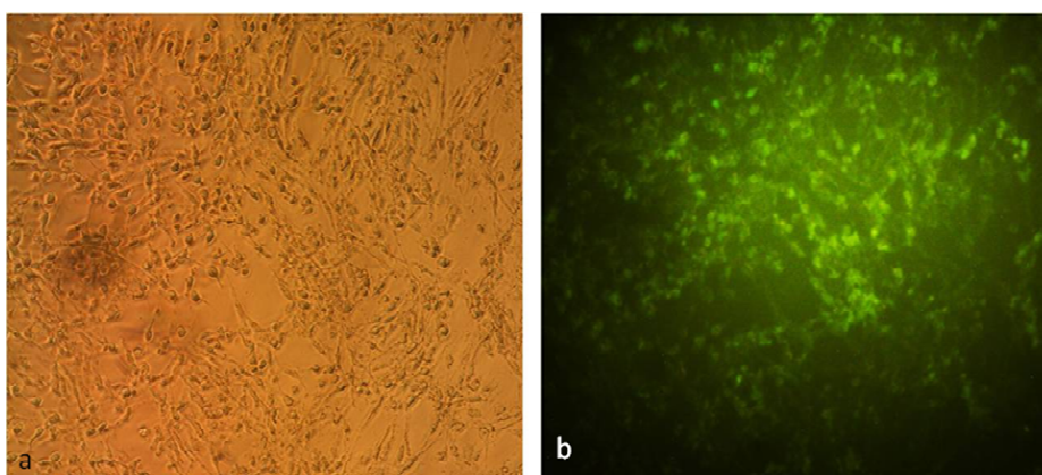
miRNA بر ژن هدف

به منظور ترانسفکت سلول های C2C12 با ترکیب لیپو فکتامین و پلاسمید کد کننده miR-135، ابتدا این سلول ها بستر کشت جدا شد و با ترکیبی از مقادیر مختلف لیپو فکتامین و پلاسمید کد کننده miR-135 ترانسفکت شدند تا غلظت مناسب جهت انجام کار به دست آمد. همزمان با ترسفکت کردن سلولها محیط تمایزی نیز به سلولها افزوده شد. فرآیند تمایز معمولاً سه روز به طول می انجامید انجام واکنش ترانسفکشن سلولی و کیفیت تقریبی آن در سلولهای C2C12 به کمک رنگ GFP در مورد ژن miR-135 تعیین میشد. برای ژن miR-135، و ژن INSR کیفیت افزایش یا کاهش بیان ژن به کمک real time PCR و توسط پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای آنها صورت گرفت. در این موارد RNA تخلیص شده از سلول بنیادی ترانسفکت شده در مقابل سلول های ترانسفکت نشده روز سه سنجیده می شد. شکل های

زیر کیفیت ترانسفکت سلول ها را با لیپوزوم های حامل ژن miR-135 و وکتور خالی pCDH را در روز سوم بعد از ترانسفکشن نشان می دهد..



شکل ۴-۱۵: ترانسفکت سلولهای C2C12 با وکتور pCDH به عنوان کنترل نرمال. a: نمای سلولهای ترانسفکت شده با میکروسکوپ نوری. b: نمای سلولهای ترانسفکت شده با میکروسکوپ فلورسنت



شکل ۴-۱۶: ترانسفکت سلولهای C2C12 با وکتور pCDH حاوی miR-135. a: نمای سلولهای ترانسفکت شده با میکروسکوپ نوری. b: نمای سلولهای ترانسفکت شده با میکروسکوپ فلورسنت

۴-۱۰-۱- ارزیابی بیان ژن های هدف توسط Real-Time PCR

از رده سلولی C2C12 در دو حالت پایه، تمایز یافته، ترنسفکت شده با وکتور حاوی miR-135 و ترنسفکت شده با وکتور کنترل نرمال، استخراج RNA انجام شد. از RNA استخراج شده از رده سلولی تمایز یافته و ترنسفکت شده با وکتور کنترل نرمال بعنوان کنترل نرمال استفاده گردید. بررسی بیان هر ژن بصورت Real-Time PCR با پرایمرهای اختصاصی که به این منظور طراحی شده بود صورت گرفت. Real-Time PCR با شرایط شرح داده شده بصورت سه تایی^{۶۴} برای هر ژن انجام شد. از ژن β actin و ژن SNORD47(U47) بعنوان کنترل برای نرمال و همسان نمودن نتایج استفاده شد. پس از انجام Real-Time PCR و تعیین سیکل آستانه^{۶۵}، نتایج توسط نرم افزار REST 2009 مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. در این نرم افزار معنا وابسته به $P \text{ value} \leq 0.05$ است. بنابراین ژن هایی که دارای تغییر بیان معنادار افزایشی یا کاهش نسبی به گروه کنترل بودند با نوشتار UP و DOWN نشان داده شده اند.

۴-۱۰-۱- ارزیابی بیان miR-135 و INSR در رده سلولی با روش Real-Time PCR

miRNA ها توالیهای کوتاه ۱۹-۲۵ نوکلئوتیدی هستند که ردیابی آنها با پرایمرهای معمول امکانپذیر نمی باشد. برای ردیابی آنها از ساختاری بنام stem-loop استفاده شد. ساختار اولیه ساقه-لوپ از مقاله ای که در سال ۲۰۰۵ چاپ شده بود گرفته شد و با تغییراتی که در بخش روشها ذکر شد طراحی پرایمر لوپ-ساقه برای cDNA سازی، پرایمرهای سنس و آنتی سنس برای ردیابی miRNA ها انجام پذیرفت.

از استخراج RNA با روش بهبود یافته بطوریکه همزمان قادر به جداسازی همه RNA ها از جمله miRNA است برای بررسی بیان miR-135 استفاده شد. پس از انجام cDNA سازی با پرایمر RT ساقه-لوپ که برای هر miRNA با اضافه نمودن بخش انتهای توالی miRNA هدف اختصاصی شده بود، واکنش Real-

⁶⁴Triplicate

⁶⁵Cycling Threshold (C_t)

Time PCR با استفاده با شرایط بهینه شده صورت گرفت.. از ژن SNORD47(U47) بعنوان RNA ای با طول کوتاه بعنوان کنترل برای نرمال کردن نتایج استفاده شد

۴-۱۰-۲- تایید بیان miR-135 در سلولهای ترانسفکت شده با روش Real-Time-PCR

pCDH -miR135 به داخل سلولهای C2C12 در پلیت ۲۴ خانه ترانسفکت شد. در گروه کنترل پلاسمید pCDH به عنوان کنترل منفی بیان miRNA ترانسفکت شده و میزان miRNAهای آن سلول نیز به با RealTime PCR سنجش شد. برای تست تکرارپذیری آزمون دوچاهک ۲۴ خانه برای هر گروه در نظر گرفته شد. پس از ۷۲ ساعت RNA تام سلولی استخراج گردید و cDNA ساخته شده با پرایمرهای اختصاصی miRNA (جدول ۴-۹) Real Time شد. در این آزمون از snRNA سلولی Snord U47 به عنوان کنترل داخلی و ژن نرمال کننده نتایج در واکنش Real Time PCR نسبی استفاده شد.

جدول ۴-۱۱: نتایج Real-Time PCR بیان miR135 در رده سلولی C2C12 ترانسفکت شد miR135-

pCDH ه با در آنالیز با نرم افزار REST

Gene	Type	Reaction efficiency	expression	Std.Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Snord	REF	1.0	1.000				
miR135	TRG	1.0	1.537	1.473- 1.603	1.457- 1.621	0.000	Up



نمودار ۴-۴. نتایج Real Time PCR نسبی بیان miR-135 پس از ترانسفکشن. افزایش بیان ژن-miR 135 با $P \leq 0.05$ معنادار است. در کلیه موارد میزان بیان ژن در سلولهای کنترل ترانس فکت نشده معادل ۱ در نظر گرفته شده است

۴-۱۰-۳. ارزیابی اثر miR-135 بر روی سطح mRNA ی ژن INSR

پلاسمید pCDH-miR135 به داخل سلولهای C2C12 در پلیت ۲۴ خانه ترانسفکت شد. در گروه کنترل نیز پلاسمید pCDH به داخل سلولها ترانسفکت شده و میزان ترانسکریپت آن سلول نیز به با RealTime PCR سنجش شد. برای تست تکرارپذیری آزمون دوچاهک ۲۴ خانه برای هر گروه در نظر گرفته شد. سپس با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژنهای INSR (جدول ۴-۴) برای این نمونهها Real Time PCR گذاشته شد. ژن b actin به عنوان یک ژن خانه نگهدار برای کنترل داخلی تست انتخاب شد. آزمون Real Time برای هر cDNA دوبار تکرار شد نتایج خام Real Time PCR سپس توسط نرم-افزار REST 2009 آنالیز شد و نتایج با $P \leq 0.05$ به عنوان نتایج معنادار محسوب گردید (نمودار ۴-۲). کاهش بیان INSR در رده سلولی ترانسفکت شده با miR135 در مقایسه با رده سلولی کنترل ترانسفکت شده پلاسمید pCDH است تا حد زیادی قابل توجه می باشد ($pValue=0$)

جدول ۴-۱۲: نتایج Real-Time PCR بیان INSR در رده سلولی C2C12 ترنسفکت شد miR135-

pCDH با در آنالیز با نرم افزار REST

Gene	Type	Reaction efficiency	expression	Std.Error	95% C.I.	P(H1)	Result
β actin	REF	1.0	1.000				
INSR	TRG	1.0	0.168	0.155-0.183	0.155-0.183	0.000	down

TRG - Target

REF - Reference



نمودار ۴-۵. نتایج Real Time PCR نسبی بیان ژن INSR متأثر از بیان miR-135 کاهش بیان ژن

INSR با $P \leq 0.05$ معنادار(*) است. در کلیه موارد میزان بیان ژن در سلولهای کنترل ترانس فکت نشده

معادل ۱ در نظر گرفته شده است

۴-۱۱- ارزیابی میزان جذب قند در سلولهای ترنسفکت شده با *miR-135*

مراحل ارزیابی میزان جذب قند سلولهای ترنسفکت شده نیز مانند سلولهای نرمال تمایز یافته مطابق دستورالعمل انجام شده و نتایج زیر به دست آمد.

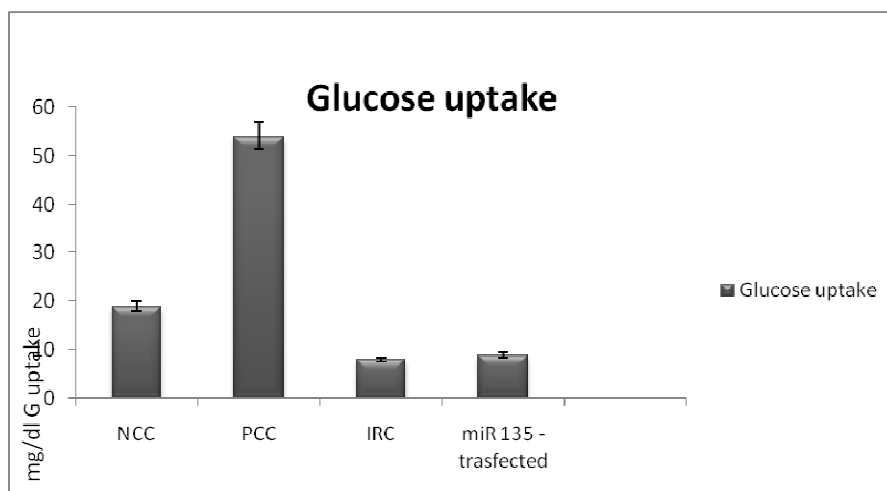
جدول ۴-۱۳: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای ترنسفکت شده در آزمون جذب قند

3 h incubation with insulin		mg/dl-media	used-mg/dl
transfected C2C12	pCDH miR135	96	8
transfected C2C12	pCDH miR135	96	8
transfected C2C12	pCDH miR135	95	9
		mean	8.3

با توجه به محاسبات فوق سلولهای تمایز یافته و ترنسفکت شده در اثر تحریک با انسولین آزمون به میزان 8.3mg/dl افزایش جذب قند را از خود نشان داده اند

جدول ۴-۱۴: نتایج ارزیابی میزان جذب قند سلولهای ترنسفکت شده و سلولهای کنترل مثبت و کنترل منفی و مقاوم به انسولین در آزمون جذب قند

	miR 135 -transfected	IRC	PCC	NCC
Glucose uptake (mg/dl)	8.3	8	54	19



نمودار ۴-۶: نتایج میزان جذب قند در سلولهای ترانسفکت شده با miR-135 و مقایسه آن با حالات مختلف سلولهای C2C12 ترانسفکت نشده. کاهش معنا دار میزان جذب قند در سلولهای ترانسفکت شده با miR-135 در مقایسه با سلولهای PCC مشاهده می شود. (نتایج سلولهای ترانسفکت شده و سلولهای IRC مشابه هستند).

۴-۱۲- مقایسه نتایج کسب شده در این پژوهش با نتایج micro array ثبت شده در GEO database

۴-۱۲-۱ مقایسه نتایج کسب شده در مرحله تمایزی سلولهای C2C12 با نتایج micro array با

شماره ثبت GEO accession #GSE4694

در راستای تایید یافته های ذکر شده از نتایج خام microarray منتشر شده آقای چن و همکاران (انجام شده بر روی سلولهای پایه و تمایز یافته C2C12) با شماره ثبت شده GEO accession #GSE4694 استفاده شد در این مقاله که با عنوان:

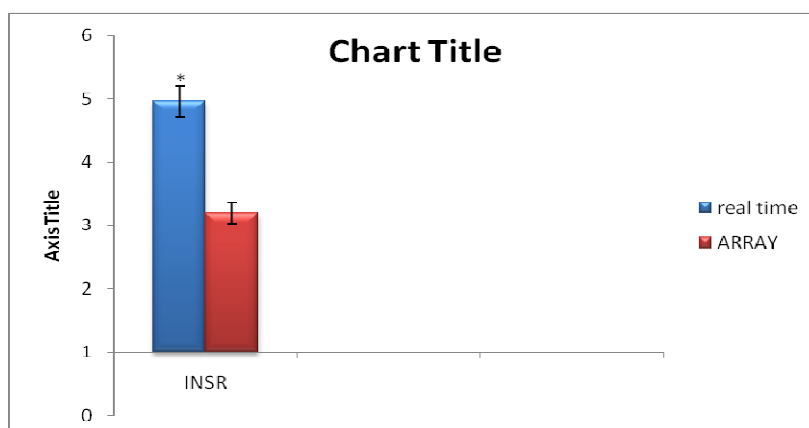
“Nuclear envelope transmembrane proteins (NETs) that are up-regulated during myogenesis” به چاپ رسیده پروتئین های غشا هسته ایی مورد بررسی قرار گرفته اند (۸۷) با این حال

نتایج نتایج خام microarray این بررسی ژنهای دیگری را نیز پوشش می داد که در آنالیز مقاله فوق شرکت داده نشده بودند. و ژن INSR یکی از این موارد اطلاعاتی آنالیز نشده در دو حالت پایه و تمایزی بود. با توجه به همسانی سلولها، شرایط و حالت فیزیولوژیک آنها با این پروژه آنالیز اطلاعات و مقایسه آنها با یافته این بررسی میسر شد.

جدول ۴-۱۵: بررسی آماری نتایج خام حاصل از مطالعه با شماره ثبت شده GEO accession #GSE4694 با استفاده از نرم افزار SPSS و انجام آزمون paired t-test

Paired Samples Test								
		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference			
					Lower	Upper		
Pair 1	INSRu - INSRd	-51.43333	19.43562	11.22116	-99.71409	-3.15258	-4.584	2
								.044

آنالیز اطلاعات خام #GSE4694 GEO accession نشان می دهد که افزایش بیان ژن رسپتور انسولین در حالت تمایزی نسبت به حالت پایه نیز با $P \leq 0.05$ معنادار است. (جدول ۴-۱۵)



نمودار ۴-۷: مقایسه نتایج میزان بیان ژن INSR در سلولهای تمایز یافته نسبت به حالت پایه ارزیابی شده توسط روش Real time پژوهش ما و روش microarray. افزایش بیان ژن INSR در هر دو روش با

$P \leq 0.05$ معنادار(*) است. در کلیه موارد میزان بیان ژن در سلولهای حالت پایه معادل ۱ در نظر گرفته شده است.

آنالیز یافته های این مطالعه افزایش ۳ فولدی ژن INSR را در نمونه های تمایز یافته نشان می داد (نمودار ۴-۷) که با نتایج کسب شده در پژوهش ما مطابقت داشت.

۴-۱۲-۲- مقایسه نتایج کسب شده مرحله مقاومت به انسولین در شرایط *invitro* روی سلولهای C2C12 با نتایج *micro array* در مرحله مقاومت به انسولین با شماره ثبت GEO accession # GSE6798 و مرحله دیابت نوع دو با شماره ثبت GEO accession # GSE26168

به منظور تایید یافته های این بررسی در مرحله مقاومت به انسولین، از اطلاعات خام بررسی ژنی با روش *microarray* دو مطالعه انسانی ثبت شده GEO accession # GSE6798 بر روی نمونه عضلانی افراد مبتلا به حالت مقاومت به انسولین (۸۸) با عنوان مقاله :

Reduced expression of mitochondrial oxidative metabolism genes in skeletal muscle of women with PCOS

و GEO accession # GSE26168 بر روی نمونه های خون افراد دیابت نوع دو (۸۹) با عنوان مقاله :

“**MicroRNA 144** impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in Type 2 Diabetes mellitus”

استفاده شده و آنالیز مورد نظر بر روی آنها انجام پذیرفت.

جدول ۴-۱۶: بررسی آماری نتایج خام حاصل از مطالعه با شماره ثبت شده GSE6798 GEO accession # با استفاده از نرم افزار SPSS و انجام آزمون paired t-test

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 INSRCONT - INSRPCO	13.58922	22.47744	6.23412	.00624	27.17221	2.180	12	.050

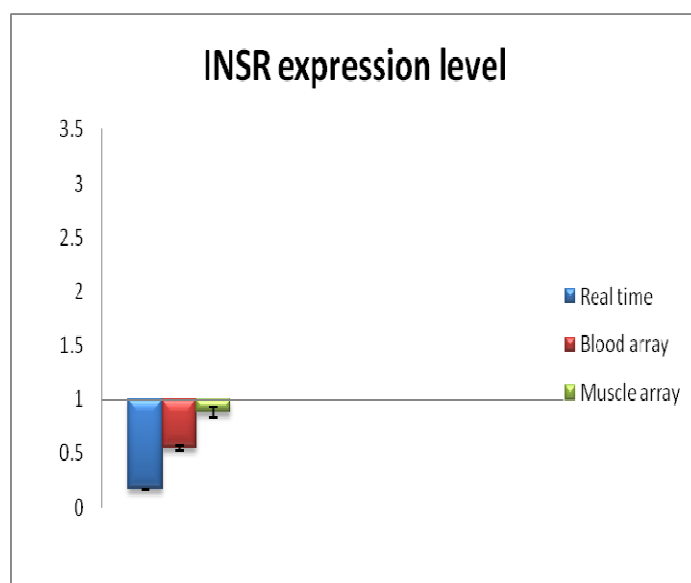
جدول ۴-۱۷: بررسی آماری نتایج خام حاصل از مطالعه با شماره ثبت شده GSE26168 GEO accession # با استفاده از نرم افزار SPSS و انجام آزمون paired t-test

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	INSRNO R - T2D	127.33750	58.11589	20.54707	78.75140	175.92360	6.197	7	.000

انالیز اطلاعات خام GSE6798 و GSE26168 GEO accessions # نشان می دهد که کاهش بیان ژن رسپتور انسولین با $P \leq 0.05$ معنادار است. (جدول ۴-۱۶ و ۴-۱۷)

نتایج آنالیز اطلاعات خام microarray در هر دو بررسی با یافته های ما همسو بوده و کاهش معنی دار میزان بیان رسیپتور انسولین را چه در نمونه های عضلانی افراد مبتلا به حالت مقاومت به انسولین و چه در نمونه های خونی افراد مبتلا به دیابت نوع دو نشان می داد (نمودار ۴-۸).



نمودار ۴-۸: مقایسه نتایج میزان بیان ژن INSR اندازه گیری شده توسط روش Real time پژوهش ما و دو روش microarray در نمونه های سلولی و بافتی مبتلا به مقاومت به انسولین. کاهش بیان ژن INSR در هر سه بررسی با $P \leq 0.05$ معنادار (*) است. در کلیه موارد میزان بیان ژن در سلولهای حالت نرمال معادل ۱ در نظر گرفته شده است.

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

شناسایی miRNA توسط آقای امبروز و همکارانش در سال ۱۹۹۳ و معرفی آن به عنوان یکی از مهم ترین عوامل تنظیم کننده عملکرد ژنوم موجودات زنده، تحولی بزرگی را در علوم مولکولی پدید آورد (۹۰) عملکرد این مولکولهای جادویی در چگونگی تنظیم بیان ژنها به اندازه ایی شگفت آور و حائز اهمیت است که گروه های تحقیقاتی فراوانی را در سراسر دنیا به بررسی نحوه عملکرد و ارتباط آنها با پدیده های مهم زیستی واداشته است.

این مولکولها در پروسه تکثیر و تمایز سلولی و ایجاد حالت سلامت و بیماری موجودات نقش موثری را ایفا می کنند. عملکرد نا مناسب این مولکولها با بروز بسیاری از بیماری ها نظیر دیابت نوع دو مرتبط شناخته شده است (۹۱).

ارتباط میان دیابت نوع دو و miRNA اول بار توسط آقای پوی و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به اثبات رسید. این گروه توانستند وجود ارتباط مستقیم میان میزان بیان miR-375 و تنظیم بیان انسولین ترشحی را به اثبات برسانند (۹۲).

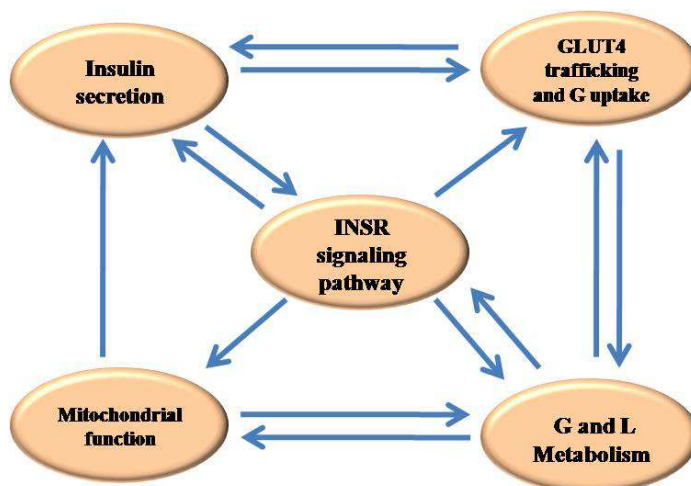
در حال حاضر بررسی نقش miRNA ها در بروز بیماری دیابت نوع دو با تمرکز بر روی بیولوژی سلولهای β پانکراس به عنوان مسئول ترشح هورمون انسولین، ایجاد حالت مقاومت به انسولین در بافت های هدف هورمون به عنوان پیش درآمد آغاز روند بیماری و کمک به فهم پیچیدگی های این بیماری از زمینه های تحقیقاتی پروژه های در حال انجام در زمینه دیابت نوع دو است. گرچه گزارشات زیادی در زمینه نحوه تاثیر گذاری miRNA ها در پاتوژنز بیماری و بافت های دیابتی منتشر شده است اما تعداد کمی از آنها روی بافت عضلانی مقاوم به انسولین متمرکز شده اند (۹۳).

ایجاد حالت مقاومت به انسولین در بافت عضلانی به عنوان گسترده ترین بافت هدف هورمون انسولین نقش ویژه ایی را در پاتوژنز بیماری دیابت نوع دو بر عهده دارد و با توجه به اینکه حالت مقاومت به انسولین سالها

پیش از بروز فنوتیپ بیماری در فرد مستعد به ابتلا رخ می دهد ، می توان امیدوار بود با مهار مرحله ایجاد مقاومت به انسولین بیماری در مراحل نخستین پیدایش آن مهار یا به تاخیر انداخته شود.

برای رسیدن به این مهم ، شناسایی miRNA ها و ژنهای هدف تاثیر گذار در مرحله ایجاد مقاومت به انسولین در بافت عضلانی به عنوان اهداف اصلی این پروژه انتخاب شدند.

در ادامه مطالعات مروری و بیوانفورماتیکی گسترده ایی به منظور شناسایی پروتئین های کلیدی دخیل در ایجاد فرایند مقاومت به انسولین صورت گرفت و نتایج این بررسی ها حاکی از این مساله بود که از میان مسیر های پیام رسانی مختلفی که در ایجاد بیماری دخیل هستند ،مسیر پیام رسانی گیرنده انسولین نقش محوری داشته و شامل بیشترین کاندیدا های ژنی مسئول بروز بیماری است (۹۴). (شکل ۵-۱).



شکل ۵-۱- نتایج بررسی های بیوانفورماتیک جهت بررسی ژنهای کاندید ایجاد مرحله مقاومت به انسولین. یافته ها حاکی از محوریت ژنهای دخیل در مسیر پیام رسانی INSR است (۹۴).

با توجه به گزارشات ثبت شده ، در آغاز فرایند بیماری دیابت نوع دو میزان ترشح هورمون انسولین در حد نرمال وجود دارد اما به دلیل عدم پاسخ دهی مناسب سلول هدف در نتیجه عملکرد نامناسب مسیر های پیام رسانی هورمونی، جذب قند سلولی به خوبی صورت نگرفته و میزان قند خون افزایش می یابد. در این حالت

فنوتیپ مقاومت به هورمون در حال شکل گیری است. بنابراین سلولهای پانکراس برای جبران عملکرد نامناسب سلولهای هدف هورمون میزان بیشتری هورمون انسولین ترشح می کنند تا بتوانند قند خون را در محدوده نرمال نگه دارند. متأسفانه این تدبیر سلولی نیز کارایی همیشگی نداشته و سرانجام به دلیل خستگی سلولهای پانکراس تولید انسولین نیز کاهش یافته و بیماری وارد سیر قهقرایی خود می گردد. بنابراین عملکرد نامناسب هر یک از اجزا اصلی مسیر پیام رسانی انسولین می تواند به بروز حالت مقاومت به هورمون ختم شود.

در گام بعدی به منظور یافتن miRNA های تنظیم کننده ژنهای درگیر در مسیر ایجاد حالت مقاومت به انسولین از نرم افزار های تخصصی پیش بینی کننده متعددی استفاده شد. آزمونهای بیوانفورماتیک با الگوریتمهای گوناگون توانمندی پیش‌بینی ژنهای هدف یک miRNA را به پژوهشگر می‌دهند. ولی واقعیت این است که پیش‌بینی این نرم‌افزارها دارای مثبت کاذب زیادی است که باید با آزمونهای تکمیلی نتایج آنها را تایید نمود. برای پیش‌بینی ژنهای هدف miRNA های انسانی و موشی نرم‌افزارهای رایج شامل Targetscan، و نرم افزار های miRDB، miRanda، Diana-microT، موجود در برنامه miRWalk، می-باشند این نرم‌افزارها با تکیه بر دو وجه زیست شناسی miRNA ها دارای یک برنامه و الگوریتم بسیار معتبر و از سویی دیگر سخت گیرانه برای معرفی ژنهای هدف می‌باشند. آنها با بررسی تکاملی جایگاههای هدف در بین گونه‌های مختلف و بررسی انواع سیدهای کلاسیک اتصال miRNA با ژن هدف ژنهای هدف را معرفی می-کنند. با تجمیع تمامی یافته‌های حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی ژن INSR به عنوان هدف پروژه انتخاب شده و سپس با استفاده از نرم افزار های پیش‌بینی کننده miRNA و ارزیابی جدول امتیاز دهی که برای ژن INSR به دست آمد، اولین (miR-135) miRNA که احتمال هدفگیری کردن INSR را داشت به عنوان miRNA تنظیم کننده میزان بیان ژن رسپتور انسولین انتخاب شد.

ابتدا ژن miR-135 از DNA ژنومیک بافت کبد موشی تخلیص و در وکتور مناسب کلون گردید تا در پروسه ترنسفکشن بکار گرفته شود.

سپس به دلیل اهمیت ویژه بافت عضلانی در ایجاد بیماری، لاین سلولی C2C12 مشتق از سلولهای عضلانی موش به عنوان سلول مدل انتخاب و مراحل القا تمایز جهت رسیدن به فرم کامل و بیان کننده تمامی پروتئین

های مسیر پیام رسانی انسولین طی شد. اثبات حالت تمایزی سلولها با بررسی مارکرهای سلولی اختصاصی حالت پایه و تمایز یافته با روش Real Time PCR و ایمونوسیتوشیمی در سطح بیان ژن و پروتئین صورت پذیرفت.

افزایش معنی دار میزان بیان ژن myoD و پروتئین میوزین (نشانگر های اختصاصی حالت تمایز یافته سلولهای عضلانی) به همراه کاهش بیان معنی دار ژن فاکتور رونویسی PAX 7 (نشانگر اختصاصی حالت تمایز نیافته سلولهای عضلانی) در حالت تمایز یافته نسبت به حالت پایه میوبلاستی ($p \text{ value} \leq 0.05$) گواه این مدعاست (شکل ۴- ۱۳ و نمودار ۴-۱).

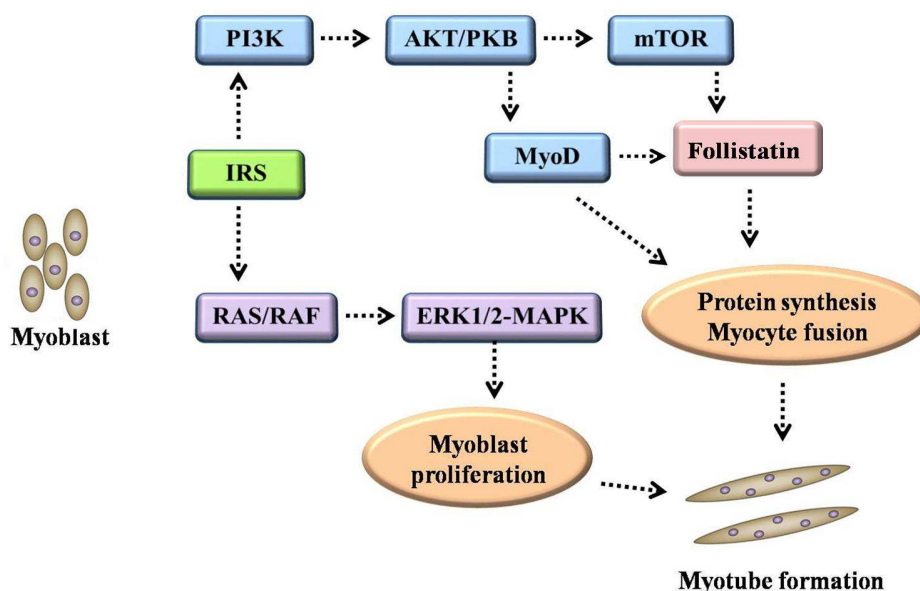
در مرحله بعد به منظور ایجاد مدل فنوتیپ مقاومت به انسولین (IRC) سلولها به مدت ۷۲ ساعت در مجاورت محیط تمایزی حاوی ۱۰۰ نانومولار انسولین قرار گرفته (حالت شبیه سازی شده hyperinsulinemia) و میزان جذب قند سلول به صورت غیر مستقیم اندازه گیری شد.

نتایج حاکی از وجود اختلاف معنی دار ($p \text{ value} \leq 0.05$) میان جذب قند توسط سلولهای کنترل مثبت و سلولهای IRC بود (نمودار ۳-۳). انسولین محرک استفاده شده در مرحله ازمون جذب قند به صورت معنی داری باعث افزایش جذب قند در سلولهای کنترل مثبت سالم شده بود اما سلولهای IRC به این میزان انسولین واکنشی نشان نداده و حتی نتایج پایین تری از سلول های کنترل منفی سالم (سلولهای سالمی که در مرحله ازمون انسولین محرک را دریافت نکرده بودند) را نشان دادند. بنابراین ایجاد فنوتیپ مقاومت به انسولین در سلولهای IRC به دلیل عدم افزایش جذب قند در پاسخ به انسولین ازمون استفاده شده در آزمایش جذب قند تایید گردید.

بررسی میزان تغییرات ژنی در سلولهای C2C12 از حالت پایه میوبلاستی به حالت تمایز یافته بیانگر افزایش معنی دار میزان بیان ژن INSR بود (نمودار ۴-۲). مطالعات گذشته نشان داده اند که مسیر پیام رسانی IRS/PI3K/AKT یکی از مکانیسم های مولکولی دخیل در روند تکاملی سلولهای عضلانی است (۹۵). این مسیر از طریق فعال سازی ERK1/2 که مورد نیاز تکثیر سلولهای پایه ایی میوبلاستی است از یک سو و فعال سازی مسیر پیام رسانی mTOR -مورد نیاز جهت اتصال سلولها به یکدیگر و ساخت میوتیوپ- از سوی دیگر

باعث تکامل و تمایز سلولهای عضلانی از حالت پایه به حالت عملکردی و تمایز یافته گردد (شکل ۵-۲) (۹۸-)

(۹۶)



شکل ۵-۲: مراحل تمایز سلولهای پایه میوبلاستی به حالت تمایز یافته در بافت عضلانی

به نظر می رسد فعال سازی IRS کلید آغازین این پروسه تکاملی است. بنابراین با توجه به یافته های این پژوهش افزایش بیان رسپتورهای تیروزین کینازی مانند INSR نیز به عنوان فعال کننده مولکول آغازگر IRS می تواند نقش به سزایی را در تکمیل فرایند تمایزی به عهده گیرد (۹۸).

در راستای تایید یافته های ذکر شده از نتایج خام microarray منتشر شده آقای چن و همکاران (انجام شده بر روی سلولهای پایه و تمایز یافته C2C12) با شماره ثبت شده GEO accession #GSE4694 استفاده شد (۸۷). شایان ذکر است مطالعات فوق تنها در نوع فنوتیپ سلولی با این پژوهش مشابه بوده و با هدف بررسی ژنهای فاکتور رونویسی انجام پذیرفته بود اما اطلاعات خام microarray آنها کلیه ژنهای درگیر در مسیر پیام رسانی انسولین را نیز شامل می شد. آنالیز یافته های این مطالعه افزایش ۳ فولدی ژن INSR را در نمونه های تمایز یافته نشان می داد که با نتایج کسب شده در پژوهش ما مطابقت داشت (۹۸) (نمودار ۴-۷).

در گام بعدی، ترنسفکت سلولهای C2C12 با لیپوزوم های حاوی وکتور pCDH-miR-135 همزمان با انجام پروسه تمایز سلولی منجر به افزایش بیان ۱/۵ فولدی miR-135 در سلولهای تست نسبت به سلولهای کنترل گردید (نمودار ۳-۴). بیان نشانگر GFP در سلولهای ترنسفکت شده با miR-135 درخشندگی کمتری را نسبت به سلولهای کنترل ترنسفکت شده با pCDH نشان می داد. به نظر می رسد القا بیان miR-135 در سلولها روی چرخه پروتئین سازی و قدرت بیان نشانگر GFP نیز موثر بوده است.

با توجه به آنالیز نتایج کسب شده در نرم افزار REST افزایش ۱/۵ فولدی بیان miR-135 با کاهش ۸۰ درصدی بیان ژن INSR در سلولهای ترنسفکت شده با miR در مقایسه با سلولهای کنترل همراه بود. بیان ژن INSR در مقایسه با سلول کنترل نرمال به میزان ۰/۱۶۸ فولد کاهش یافته بود (جدول ۴-۱۲). نمودار (۴-۵).

اگرچه به صورت رایج محل اثر miRNA را در سطح بیان پروتئین و متوقف کردن فرایند ترجمه می دانند ولی تحقیقات نشان داده است که در پستانداران miRNAها به صورت چشمگیری سطح mRNAهای هدفشان را پایین می آورند و به ادعای دکتر دیوید بارتل و همکارانشان ناپایدار کردن mRNAی هدف، اصلی ترین نقش miRNA در پستانداران به منظور کنترل بیان ژن های مورد نظر می باشد (۹۹). بر اساس این گزارش؛ بررسی کمی سطح بیان mRNA هدف با Real Time PCR می تواند یک شاخص مناسبی برای آزمون اثر miRNA سلولی بر ترانسکریپت های هدفش باشد. بر اساس نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی miR-135 حاوی ناحیه اتصال (توالی سید) برای ژن INSR است که این ژن را به هدف مناسبی برای miR-135 تبدیل ساخته است و نتایج آزمونهای ما نشان داد که ترانسکریپت miR-135 به صورت معناداری سطح mRNAی ژن INSR را کاهش داده است.

نتایج حاصل از بررسی میزان جذب قند سلولهای ترنسفکت شده با miR-135 در مقایسه با سلولهای ترنسفکت شده با وکتور pCDH، سلول نرمال و سلول مدل مقاومت به انسولین نیز جالب به نظر می رسد. سلولهای ترنسفکت شده با miR-135 کاهش معنی داری را در میزان جذب قند تحریک شده با انسولین از آزمون خود نشان داده ($p \leq 0.05$) و نتایجی مشابه حالت حالت مقاوم (IRC) به انسولین بروز دادند (نمودار

۴-۶). در حالیکه سلولهای نرمال کنترل مثبت به تحریک انسولین آزمون پاسخ داده و میزان جذب قند افزایش یافته ایی را نشان داده اند. در تفسیر یافته های فوق می توان به این نکته اشاره نمود که کاهش یا مهار بیان موثر ژن INSR در حضور miR-135 القا شده در سلول، سبب آسیب رسیدن به عملکرد های فرودست ترشح هورمون انسولین شده است. INSR یکی از کلیدی ترین اجزا چرخه پیام رسانی هورمون به شمار می رود. فعال شدن رسپتور انسولین سبب فعال سازی اجزاء فرودست مسیر پیام رسانی هورمون نظیر IRS و PI3K و AKT شده و در ادامه به جذب سلولی گلوکز توسط ناقلین ویژه و ذخیره سازی آن به صورت گلیکوژن منجر می گردد (۹۴). فعال سازی این مسیر کاهش قند خون را در پی خواهد داشت. بنابراین بیان نامناسب و غیر طبیعی INSR می تواند به طور جدی مسئول ایجاد نقص در فرایند جذب سلولی قند توسط بافت هدف هورمون بوده و باعث ناکارآمدی انسولین مترشحه از پانکراس باشد که به فنوتیپ مقاومت به انسولین و نهایتاً بیماری دیابت نوع دو منجر می شود. یافته های ما نیز بیانگر این نکته است که القا بیان miR-135 در سلول های C2C12 با کاهش موثر بیان INSR و همچنین ایجاد فنوتیپ مقاومت به انسولین همراه شده است.

گروه آقای هال و همکاران در مطالعات متا آنالیز ژنتیکی که در نتایج آن در سال ۲۰۱۲ به چاپ رسیده است ژن INSR را در لیست کاندیداهای قوی مرتبط با بروز بیماری دیابت نوع دو قلمداد کرده اند (۱۰۰). از سوی دیگر با بررسی مطالعات گذشته در مورد نحوه بیان ژن INSR در بیماران نتایج مشابهی به دست آمد. گروه آقای ایمانو و همکارانش کاهش میزان بیان INSR در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو را مشاهده نمودند که با یافته های این پژوهش هم راستا بود (۱۰۱).

در ادامه به منظور تایید یافته های این بررسی از اطلاعات خام بررسی ژنی با روش microarray دو مطالعه انسانی ثبت شده GEO accession # GSE6798 بر روی نمونه های نمونه عضلانی افراد مبتلا به حالت مقاومت به انسولین و GEO accession # GSE26168 بر روی خون افراد دیابت نوع دو استفاده شده و آنالیز مورد نظر بر روی آنها انجام پذیرفت (۸۹-۸۸).

شایان ذکر است مطالعات فوق تنها در نوع بیماری با این پژوهش مشابه بوده و با هدف بررسی ژنهای دیگری بجز INSR انجام پذیرفته بودند اما اطلاعات خام microarray آنها کلیه ژنهای در گیر در مسیر پیام رسانی انسولین را نیز شامل می شدند.

نتایج آنالیز اطلاعات خام microarray در هر دو بررسی با یافته های ما همسو بوده و کاهش معنی دار میزان بیان رسپتور انسولین را چه در نمونه های عضلانی افراد مبتلا به حالت مقاومت به انسولین و چه در نمونه های خونی افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ نشان می داد (نمودار ۴-۸). بنابراین به نظر می رسد کاهش بیان ژن INSR به عنوان یکی از عوامل دخیل در ایجاد حالت مقاومت به انسولین و نهایتا بروز فنوتیپ بیماری دیابت نوع دو قابل توجه باشد.

هم راستا با یافته های این بررسی در ارتباط با نقش miR-135 در پاتوژنز بیماری ، اخیرا پژوهشی در سال ۲۰۱۳ به چاپ رسیده که ارتباط میان miR-135 و ژن IRS2 را ارزیابی نموده و نشان داده است که بیان miR-135 در بافت عضلات اسکلتی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو افزایش یافته و خاموش سازی بیان-miR-135 به کنترل بهتر قند بالای خون و بهبود وضعیت تحمل به گلوکز کمک می کند (۱۰۲).

این نکته که هر miRNA می تواند اهداف مولکولی متفاوتی را به صورت همزمان کنترل نماید به عنوان یکی از اصول انکار ناپذیر نحوه عملکرد این مولکولهای تنظیمی به رسمیت شناخته شده است (۱۰۳). از سویی دیگر هدف گیری همزمان چند مولکول متفاوت اما مرتبط به یک مسیر بیولوژیک مشخص توسط یک miRNA ویژه حایز اهمیت بوده و نقش تنظیم کنندگی miRNA مورد نظر را تایید می نماید. بنابراین با جمع بندی میان یافته های بررسی ما و پژوهش ذکر شده به نظر می رسد miR-135 قادر است نقش تعیین کننده ای را در ایجاد بیماری دیابت نوع دو ایفا کند. زیرا بیان بالای miR-135 قادر است اثر منفی بر فرایند جذب گلوکز از طریق هدف گیری اجزا مسیر پیام رسانی هورمون انسولین منجمله INSR داشته و به روند بیمارزایی کمک کند. همراهی یافته های ما با نتایج میزان بیان miR-135 در نمونه بیماران مبتلا به دیابت نوع دو نیز نشان از اهمیت حضور این miRNA در پاتوژنز بیماری دارد.

۵-۲- نتیجه گیری

القا miR-135 در لاین سلولی C2C12 با بیان کاهشی INSR و بروز حالت مقاومت به انسولین همراه بوده است. با توجه به یافته های این پژوهش، نظر می رسد بیان بالای miR-135 و کاهش میزان بیان INSR از طریق ایجاد اختلال در مسیر پیام رسانی انسولین باعث کاهش توانایی سلول در افزایش جذب قند تحریک شده با انسولین از مون شده و به روشنی سبب بروز فنوتیپ مقاومت به انسولین در سلول شده است.

با اینحال مطالعات تکمیلی بایستی در جهت فهم بهتر ارتباط نقش پیچیده این miRNA و mRNA هدف آن انجام پذیرد. اشکار سازی نقش تنظیمی و نحوه عملکرد miR-135 و سایر miRNA های عضلانی اطلاعات ما را در زمینه فهم بهتر چگونگی ایجاد فرایند مقاومت به انسولین و به دنبال آن بروز بیماری دیابت نوع دو افزایش می دهد. بکار گیری توام مطالعات بیوانفورماتیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی نه تنها پیچیدگی های شبکه تنظیمی miRNA های دخیل در پروسه مقاومت به انسولین را روشن ساخته و با افزایش دانش بشری درک بهتری از مکانیسم ایجاد بیماری دیابت نوع دو ایجاد می کند، بلکه با معرفی کاندیداهای miRNA مهم و موثر میتواند به ایجاد فرصت های جدید جهت ابداع رویکرد های مولکولی نوین تشخیصی و درمانی منجر شود.

۵-۳- پیشنهاد ها

در گام های بعدی بررسی دقیق تر نحوه عملکرد و هدف گیری miR-135 و ژن INSR با استفاده از تست های تکمیلی نظیر تست لوسیفراز و تست های بررسی بیان در سطح پروتئین مانند وسترن بلات میتواند به پر بارتر شدن نتایج این پژوهش کمک کند.

در ادامه می توان با طراحی مطالعات *invivo* و تلقیح miR-135 به حیوان آزمایشگاهی سالم و یا تلقیح antagomiR-135 به مدل حیوانی بیماری دیابت نوع دو ، به بررسی اثرات بیولوژیک این تداخل ژنتیکی در پروسه ایجاد بیماری دیابت نوع دو پرداخت.

پیگیری میزان بیان miR-135 و INSR در گروه های مختلف شامل نمونه های مستعد به ابتلا به بیماری ، نمونه های مبتلا به حالت مقاومت به انسولین و نهایتاً نمونه های بیمار دیابت نوع دو چه در مدل های موشی

بیماری و چه انسانی می تواند به بررسی دقیق تر میزان بیان و نحوه ارتباط این مولکولها با یکدیگر منجر گردد.

از سویی دیگر با در نظر گرفتن توانایی انتقال miRNA های بافتی به خون، بررسی امکان استفاده از miR-135 به عنوان بیومارکر خونی شناسایی مرحله مقاومت به انسولین در افراد مستعد به ابتلا بیماری دیابت نوع دو می تواند به عنوان هدف مطالعات بعدی قلمداد گردد.

منابع

1. Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. I. Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15:539–553.
2. Tiinamäija Tuomi. Type 1 and Type 2 Diabetes. What Do They Have in Common? *Diabetes* Dec 2005; 54; s; 2: s40-s45.
3. American diabetes association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes* Jan 2004 Care; 27;s 1: s55-s60.
4. Kawasaki E. Type 1 diabetes and autoimmunity. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2014 Oct;23(4):99-105.
5. Henstridge DC, Whitham M, Febbraio MA. Chaperoning to the metabolic party: The emerging therapeutic role of heat-shock proteins in obesity and type 2 diabetes. *Mol Metab.* 2014 Aug 30;3(8):781-93.
6. Bouthoorn SH, Silva LM, Murray SE, Steegers EA, Jaddoe VW, Moll H, Hofman A, Mackenbach JP, Raat H.- Low educated women have an increased risk of gestational diabetes mellitus: the Generation R Study. *Acta Diabetol.* 2014 Oct 26.
7. Pandey A, Chawla S, Guchhait P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. *IUBMB Life.* 2015 Jul;67(7):506-13.
8. Alan R. Saltiel. New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell* February 23 2001; 104: 517–529.
9. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes.* 2015 Jun 25;6(6):850-67.
10. Rathmann W, Giani G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004 Oct; 27 (10): 2568-9
11. Silke A. Schäfer, Fausto Machicao, Andreas Fritsche, Hans-Ulrich Häring New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. *Diabetes research and clinic practice* (2011); 93 S: S9–S24.
12. Maciej T. Malecki. Type 2 Diabetes Mellitus and its Complications: From the Molecular Biology to the Clinical Practice. *The Review of Diabetic Studies* 2004; 1; No. 1: 5-8.
13. Vinciguerra F, Baratta R, Farina MG, et al. Very severely obese patients have a high prevalence of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Acta Diabetol* 2013 Jun; 50 (3): 443-9
14. Dunmore SJ, Brown JE. The role of adipokines in beta-cell failure of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 2013 Jan 2; 216 (1): T37-45
- 15- American Diabetes Association (January 2010).] “Diagnosis and classification of diabetes mellitus”. *Diabetes Care.* 33 Suppl 1 (Supplement_1): S62–9. doi:10.2337/dc10-S062. PMC 2797383. PMID 20042775.
- 16- Williams textbook of endocrinology. (12th ed.). Philadelphia: Elsevier/Saunders. pp. 1371–1435. ISBN 978-1-4377-0324-5.

- 17- International Expert, Committee .International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* .2009 Jul. 32 (7): 1327–34.
- 18-American Diabetes Association Diagnosis and classification of diabetes mellitus .*Diabetes Care*. 2012 Jan;35 Suppl 1:S64-71. doi: 10.2337/dc12-s064.
- 19- Diabetes mellitus a guide to patient care. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007. p. 201. ISBN 978-1-58255-732-8.
- 20- Tahrani AA, Bailey CJ, Del Prato S, Barnett AH. Management of Type 2 diabetes: new and future developments in treatment. *Lancet* July 9, 2011; 378: 182-97
- 21- Picot, J; Jones, J, Colquitt, JL, Gospodarevskaya, E, Loveman, E, Baxter, L, Clegg, AJ. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systematic review and economic evaluation. *Health technology assessment* (Winchester, England) .2009 Sep.13 (41): 1–190, 215–357, iii–iv.
- 22-Frchetti KJ, Goldfine AB.Bariatric surgery for diabetes management. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009 Apr;16(2):119-24.
- 23-Colucci RA. Bariatric surgery in patients with type 2 diabetes: a viable option. *Postgrad Med*. 2011 Jan;123(1):24-33..
- 24- Amiri L, John A, Shafarin J, Adeghate E, Jayaprakash P, Yasin J, Howarth FC, Raza H. Enhanced Glucose Tolerance and Pancreatic Beta Cell Function by Low Dose Aspirin in Hyperglycemic Insulin-Resistant Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki (GK) Rats.*Cell Physiol Biochem*. 2015;36(5):1939-50.
25. Watanabe RM. The genetics of insulin resistance: Where's Waldo? *Curr Diab Rep* 2010 Dec; 10 (6): 476-84
26. Balamatsias D, Kong AM, Waters JE, et al. Identification of P-Rex1 as a novel Rac1-guanine nucleotide exchange factor (GEF)that promotes actin remodeling and GLUT4 protein trafficking in adipocytes. *J Biol Chem*2011 Dec 16; 286 (50): 43229-40
27. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012 Mar 2; 148 (5): 852- 71
28. Guthrie RM. Evolving therapeutic options for type 2 diabetes mellitus: an overview. *Postgrad Med* 2012 Nov;124 (6): 82-9
29. Schwenk RW, Angin Y, Steinbusch LK, et al. Overexpression of vesicle-associated membrane protein (VAMP) 3, but not VAMP2, protects glucose transporter (GLUT) 4 protein translocation in an in vitro model of cardiac insulin resistance. *J Biol Chem* 2012 Oct 26; 287 (44): 37530-9
30. Chiu TT, Patel N, Shaw AE, et al. Arp2/3- and cofilin-coordinated actin dynamics is required for insulin-mediated GLUT4 translocation to the surface of muscle cells. *Mol Biol Cell* 2010 Oct 15; 21 (20): 3529-39
31. Keshavarz B, Ziaee A, Javadi A, et al. Comparison of insulin secretion and resistance in patients with acute coronary syndrome. *JQUMS* 2008; 12 (3): 7-14 [In Persian]
32. Rao X, Zhong J, Xu X, et al. Exercise Protects against diet-induced insulin resistance through downregulation of protein kinase C β in mice. *PLoS One* 2013 Dec 9; 8 (12): e81364

33. Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci* 2007 Mar; 32 (2): 405-13
34. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 2005 Mar; 146 (3): 1473-81
35. Veilleux A, Houde VP, Bellmann K, Marette A. Chronic inhibition of the mTORC1/S6K1 pathway increases insulin-induced PI3K activity but inhibits Akt2 and glucose transport stimulation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2010 Apr; 24 (4): 766-78
36. Zhang J, Gao Z, Yin J, et al. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J Biol Chem* 2008 Dec 19; 283 (51): 35375-82
37. Toledo K, Aranda M, Asenjo S, et al. Unsaturated fatty acids and insulin resistance in childhood obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014 May 1; 27 (5-6): 503-10
38. Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, et al. Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* 2005 Mar; 146 (3): 1328-37
39. Ingram KH, Hill H, Moellering DR, et al. Skeletal muscle lipid peroxidation and insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2012 Jul; 97 (7): E1182-6
40. Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 2010 Jun; 25(2): 119-29
41. Shinozaki S, Choi CS, Shimizu N, et al. Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice. *J Biol Chem* 2011 Oct 7; 286 (40):34959-75
42. Tsou RC, Bence KK. The genetics of PTPN1 and obesity: insights from mouse models of tissue-specific PTP1B deficiency. *J Obes* 2012; 2012: 926857
43. Tsou RC, Bence KK. Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. *Front Neurosci* 2013 Jan 7; 6:192
44. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001;107:823-826.
45. Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:252-263.
46. Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* 2004;5:396-400.
47. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
48. Appasani K. Micro RNAs: from basic science to disease biology. New York, USA: Cambridge university press; 2008.
49. Fallar M, Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 2008;1779:663-667.
50. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 2006;108:3646-3653.
51. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004;18:3016-3027.
52. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051-4060.

- 53.Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science* 2003;299:1540.
- 54.Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415-419.
- 55.Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231-235.
- 56.Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001;106:23-34.
- 57.Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17:3011-3016.
- 58.Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003;115:209-216.
- 59.Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115:199-208.
- 60.Mallory AC, Reinhart BJ, Bartel D, Vance VB, Bowman LH. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15228-15233.
- 61.Mendes ND, Freitas AT, Sagot M-F. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets. *Nucl. Acids Res.* 2009;37:2419-2433.
62. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.

- 63.Lin SL, Ying SY. Combinational therapy for potential HIV-1 eradication and vaccination. *Int J Oncol* 2004;24:81-88.
- 64.Amit K. Pandey, Priyanka Agarwal, Kirandeep Kaur and Malabika MicroRNAs in Diabetes: Tiny Players in Big Disease. *Cell Physiol Biochem* 2009; 23:221-232.

- 65.I. G. M. Kolfshoten, E. Roggli, V. Nesca and R. Regazzi. Role and therapeutic potential of microRNAs in diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2009;11 ;Suppl. 4: 118–129.
66. Schafer SA, Machicao F, Fritsche A, et al. New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. *Diabetes Res Clin Pract* 2011 Aug; 93 Suppl 1: S9-24
- 67.Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18 :997–1006
- 68.Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010; 107:810–7.
- 69- Niels Grarup & Thomas Sparsø & Torben Hansen. Physiologic Characterization of Type 2 Diabetes–Related Loci. *Curr Diab Rep* (2010) 10:485–497.
- 70.B. M. Herrera & H. E. Lockstone & J. M. Taylor & M. Ria & A. Barrett & S. Collins & P. Kaisaki & K. Argoud & C. Fernandez & M. E. Travers & J. P. Grew & J. C. Randall & A. L. Gloyn & D. Gauguier & M. I. McCarthy & C. M. Lindgren. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2010; 53:1099–1109.

71. Esguerra JL, Bolmeson C, Cilio CM, Eliasson L. Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat. *PLoS One* 2011 Apr 7; 6 (4): e18613
- 72- Delgado I, Huang X, Jones S, Zhang L, Hatcher R, Gao B, Zhang P. Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics*. 2003 Aug; 82(2):109-21.
- 73- Janot M, Audfray A, Lorient C, Germot A, Maftah A, Dupuy F. Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. *BMC Genomics*. 2009 Oct 20; 10:483.
- 74- Naresh Kumar, S. Dey. Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and independent pathways in insulin resistant muscle cells. *British Journal of Pharmacology*. 2002. 137, 329 – 336.
- 75- X Fang, R Palanivel, X Zhou, Y Liu, A Xu1, Y Wang and G Sweeney. Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6 myoblasts. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2005. 35, 465–476
- 76- Naresh Kumar and Chinmoy S. Dey. Gliclazide increases insulin receptor tyrosine phosphorylation but not p38 phosphorylation in insulin-resistant skeletal muscle cells. *The Journal of Experimental Biology*. 2002. 205, 3739–3746
- 77- Gallant M, Odei-Addo F, Frost CL, Levendal RA. Biological effects of THC and a lipophilic cannabis extract on normal and insulin resistant 3T3-L1 adipocytes. *Phytomedicine*. 2009 Oct; 16(10):942-9.
- 78- Gayle Pamela Wilson. Degree Magister Scientiae in the Faculty of Science at the Nelson Mandela Metropolitan University. Optimization of an in vitro model for anti-diabetic screening. 2006. Supervisor: Dr S Roux. Co-Supervisor: Dr M van de Venter. page :34-37
- 79- Megan Gallant. Degree Magister Scientiae in the Faculty of Science at the Nelson Mandela Metropolitan University. In Vitro effects of endogenous and exogenous cannabinoids on insulin resistance and secretion.. January 2009. Supervisor: Mrs. R. A. Levendal. Co-Supervisor: Prof. C.L. Frost. Page:38
- 80- Wayne Chadwick. Degree of Masters in the Faculty of Science at the University of Port Elizabeth. Observed metabolic changes in male wistar rats after treatment with an antidepressant implied in undesirable weight gain or *SUTHERLANDIA FRUTESCENS* for type 2 diabetes. January 2003. Supervisor: Dr S. Roux. Co-Supervisor: Dr M. van de Venter and Prof W. Oelofsen. page:92
- 81- Joel Escobedo and Timothy J. Koh. Improved transfection technique for adherent cells using a commercial lipid reagent. *BioTechniques* November 2003. 35:936-940
- 82- Mehmet Deniz Ayuz, Burcu Balcihayty, Pervin R. Dincer. An efficient method for stable transfection of mouse myogenic C2C12 cell line using a nonviral transfection approach. *Turk J Med Sci* 2011; 41 (5): 821-825

- 83- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005 Nov 27;33(20):e179.
- 84- Lagha M, Sato T, Bajard L, Daubas P, Esner M, Montarras D, Relaix F, Buckingham M. Regulation of skeletal muscle stem cell behavior by Pax3 and Pax7. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008;73:307-15.
- 85- Moran JL, Li Y, Hill AA, Mounts WM, Miller CP. Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. *Physiol Genomics.* 2002 Aug 14;10(2):103-11.
- 86- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):e36.
- 87- Chen IH, Huber M, Guan T, Bubeck A, Gerace L. Nuclear envelope transmembrane proteins (NETs) that are up-regulated during myogenesis. *BMC Cell Biol.* 2006 Oct 24;7:38.
- 88- Skov V, Glintborg D, Knudsen S, Jensen T, Kruse TA, Tan Q, Brusgaard K, Beck-Nielsen H, Højlund K. Reduced expression of nuclear-encoded genes involved in mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 2007 Sep;56(9):2349-55.
- 89- Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2011;6(8):e22839.
- 90- Ambros V. MicroRNAs and developmental timing. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Aug; 21 (4) : 511-7.
- 91- Chen H, Lan HY, Roukos DH, Cho WC. Application of microRNAs in diabetes mellitus. *J Endocrinol.* 2014 Jul;222(1):R1-R10.
92. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):226-30.
- 93- Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2014 Oct 7.
- 94- Honardoost M, Reza Sarookhani M, Arefian E, Soleimani M. Insulin Resistance Associated Genes and miRNAs. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014; 174:63-80.
95. Hamilton D, Philp A, MacKenzie M and Baar K. Prolonged activation of S6K1 does not suppress IRS or PI-3 kinase signaling during muscle cell differentiation. *BMC Cell Biol.* 2010;1

96. Jones, N.C., Fedorov, Y.V., Rosenthal, R.S.Olwin, B.B. ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *J. Cell. Physiol.* 2001; 118: 104–115
97. Jia L, Li Y, Wu G, et al. MiRNA-199a-3p Regulates C2C12 Myoblast Differentiation through IGF-1/AKT/mTOR Signal Pathway. *Int J Mol Sci.*2014; 15(1): 296–308
98. Honardoos.Mt, Masoud Soleimani,Ehsan Arefian, Mohammad reza Sarookhani. Expression Change of miR-214 and miR-135 during muscle differentiation *Cell Journal* Vol: 17, No: 3, Autumn 2015
99. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010;466:835-840.
100. Paul J Hale, Alfredo M López-Yunez, Jake Y Chen. Genome-wide meta-analysis of genetic susceptible genes for Type 2 Diabetes *BMC Systems Biology* 2012, 6(Suppl 3):S16
- 101.Imano.E, Kadowaki .H, Kadowaki, T., Iwama. N., Watari. T, Wamori, R., Ukamada.K., Taylor.S.I .1991.Two Patients With Insulin Resistance Due to Decreased Levels of Insulin-Receptor Mrna.*Diabetes.*40:548-57.
- 102.Agarwal .P., Srivastava.R.,. Srivastava.A.K., Ali.K., Datta.M.,2013. miR-135a targets IRS2 and regulates insulin signaling and glucose uptake in the diabetic gastrocnemius skeletal muscle .*Biochimica et Biophysica Acta* 1832 . 1294–1303.
103. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J .A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2009 Dec;7(4):147-54

Abstract

Background: Type 2 diabetes is the most common metabolic disorder and is recognized as one of the most important health threats of our time. The pathology of type 2 diabetes is complex, and culminating in dysregulation of blood glucose levels but caused by the development of insulin resistance and/or relative insulin deficiency. MicroRNAs (miRNAs) are a novel group of non-coding small RNAs that have been implicated in a variety of physiological processes. MiRNA-related genetic variations have been proved to be associated with human diseases, such as type 2 diabetes.

Objective: In this study, we aimed to investigate the impact of predicted miRNA and target genes on insulin resistance process because Muscle insulin resistance is clearly a risk factor for development of type 2 diabetes.

Methods: Using a bioinformatics approach miR-135 was selected by its targets INSR as insulin resistance potential factors in muscle cells. C2C12 differentiation induced by 3% horse serum. Immunocytochemistry and q-real time PCR was performed to confirm differentiation process. Chronic hyperinsulinemia was used to induce insulin resistance in the C2C12 cells (IRC) to create our model line that was confirmed by glucose uptake results. After construction of miR-135 expression vector, cells have transfected by miR-135, and then glucose uptake measurement and determination of expression level of the miRNA and its targets have done.

Findings: It was obvious that INSR gene expression was significantly down-regulated in C2C12 cell line after miR-135 transfection. Interestingly the miR-transfected cells have shown a significant difference in glucose uptake when compared to control and was the same with IRC respectively.

Conclusion: Our data shows that the lack of significant *INSR* expression level and increased level of miR-135, contributed to the poor stimulation of glucose uptake by insulin and the development of insulin resistance phenotype in C2C12 cell line.

Key word: Insulin resistance, miR-135, Insulin receptor, C2C12

Qazvin University of Medical Sciences
Faculty of Medicine



*A Thesis Presented for the Degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.) in Molecular
medicine*

**Determination of miR- 135 effect on relative expression
of INSR gene which is involved in insulin resistance
processes induced in muscle cell *in vitro*.**

By: Maryam Honardoost

**Supervisors: Dr.Mohammad reza Sarookhani
Dr.Masoud Soleimani**

Advisor: Dr.Ehsan Arefian

2015

ضمائم

مقالات مستخرج از پایان نامه

Insulin Resistance Associated Genes and miRNAs

Maryam Honardoost · Mohammad reza Sarookhani ·
Ehsan Arefian · Masoud Soleimani

Received: 30 November 2013 / Accepted: 15 June 2014 /
Published online: 2 July 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Type 2 diabetes mellitus is the result of resistance to insulin function along with inadequate insulin secretion, leading to a number of dysfunctions characterized by hyperglycemia, and it is associated with microvascular, macrovascular, and neuropathic complications. There is compelling evidence that the decline in both insulin sensitivity and insulin secretion has a genetic component. In addition, increasing evidence suggests that microRNAs (miRNAs) as key regulators of gene expression play significant roles in insulin production, secretion, and function that regulate the function of insulin-target tissues. The current review demonstrates the candidate genes and the related miRNAs involved in molecular pathogenesis of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. In doing so, it provides an opportunity for more focused investigations that may identify the genes and miRNAs with a role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and its treatment.

Keywords Type 2 diabetes mellitus · Insulin resistance · Gene · miRNA

M. Honardoost · M. reza Sarookhani
Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin,
Iran

M. Honardoost
e-mail: Marymail_58@yahoo.com

Applied Biochemistry and
Biotechnology

Applied Biochemistry and Biotechnology

Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology

Editor-in-Chief: Ashok Mulchandani

ISSN: 0273-2289 (print version)

ISSN: 1559-0291 (electronic version)

Journal no. 12010

RECOMMEND TO LIBRARIAN

Read
Online

Online First Articles
All volumes & issues
Free: Sample Articles

FOR AUTHORS AND EDITORS

2013 Impact Factor 1.87

Aims and Scope

Springer

Molecular mechanism of insulin resistance

M. Honardoost*

MR. Sarookhani**

E. Arefian***

*Ph.D. Student of Molecular Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

**Associate Professor of Biotechnology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

***Assistant Professor of Virology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

*Abstract

Type 2 diabetes is of particular importance as one of the main causes of cardiovascular diseases, renal dysfunction and their related mortality. Two main characteristics of the disease are insulin secretion defects and insulin resistance. It seems that insulin resistance is a key trigger in the pathogenesis of the disease. It is reasonable to think about how to prevent the incidence of type 2 diabetes, reduce its severity and morbidity and to postpone the disease onset by studying the molecular mechanism of insulin resistance in order to inhibit or reduce the driving proteins behind insulin resistance and to find appropriate therapeutic approaches especially based on RNAs regulating gene expression.

This review focuses on recent published molecular findings about occurrence of insulin resistance using genetic databases such as KEGG GENES and OMIM to introduce the trigger mechanism of type 2 diabetes.

Keywords: Insulin Resistance, Type 2 Diabetes Mellitus, Molecular Medicine

Corresponding Address: Mohammad Reza Sarookhani, Department of Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Qazvin University of Medical Sciences, Shahid Bahonar Blvd., Qazvin, Iran

Email: nursarookhani@qums.ac.ir

Tel: +98-28-33336001

Received: 26 Dec 2013

Accepted: 11 May 2014



Journal Users

Username: maryam
Password: *****
Log In

Register

I forgot my password

Journal Managements

OWNED: Royan Institute
CHAIRMAN:

Home Page II:

Indexed in:

1. PubMed Central (PMC)
2. National Library of Medicine (NLM)
3. Thomson Reuters (ISI) --> (Impact Factor : 1.105)
5-Year (Impact Factor : 1.034)
4. Biosis Previews
5. Index Medicus for the Eastern Mediterranean Region (IMEMR)

Original Article

Expression Change of miR-214 and miR-135 during Muscle Differentiation

Maryam Honardoost, M.Sc.^{1,2,3}, Masoud Soleimani, Ph.D.⁴, Ehsan Arefian, Ph.D.⁵,
Mohammad Reza Sarookhani, Ph.D.^{1,2*}

1. Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
2. Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
3. Department of Molecular Biology and Genetic Engineering, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran
4. Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5. Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Box: 334197-59511, Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
Email: msarookhani@qums.ac.ir

Received: 10/Aug/2014, Accepted: 8/Nov/2014

Abstract

Objective: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs that play pivotal roles in many biological processes such as regulating skeletal muscle development where alterations in miRNA expression are reported during myogenesis. In this study, we aimed to investigate the impact of predicted miRNAs and their target genes on the myoblast to myocyte differentiation process.

Materials and Methods: This experimental study was conducted on the C2C12 cell line. Using a bioinformatics approach, miR-214 and miR-135 were selected according to their targets as potential factors in myoblast to myocyte differentiation induced by 3% horse serum. Immunocytochemistry (ICC) was undertaken to confirm the differentiation process and quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) to determine the expression level of miRNAs and their targets.

Results: During myoblast to myocyte differentiation, miR-214 was significantly down-regulated while miR-135, *irs2*, *Akt2* and *Insr* were overexpressed during the process.

Conclusion: miR-214 and miR-135 are potential regulators of myogenesis and are involved in skeletal muscle development through regulating the IRS/PI3K pathway.

Keywords: Myoblast, Differentiation, miR-214, miR-135

Cell Journal (www.cjmr.ir), Vol 17, No 3, Summer 2015, Pages: 461-470


Citation: Honardoost M, Soleimani M, Arefian E, Sarookhani MR. Expression change of miR-214 and miR-135 during muscle differentiation. Cell J. 2015; 17(3): 461-470.



Introduction

Several global approaches have been applied in order to better understand the molecular mechanism of myogenesis. Skeletal muscle is derived from the somites, the embryonic structures in mammals that produce differentiated muscular tissue after progressive subdivisions (1). Myoblasts (immature muscle cells) exit from cell cycle after a defined proliferation time to then become terminally differentiated myocytes (1, 2). Finding the protein network underlying skeletal muscle differentiation will lead to a better understanding of muscle biology, muscle dysfunction and pathogenesis of vari-

ous muscular disorders, and may provide new approaches for therapy.



The fate of myogenic precursor cells is first determined by transcription factors Pax3/Pax7, followed by regulation of myogenic differentiation (MyoD) through the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) in the skeletal muscle lineage (3). *MyoD* is thus considered as a marker of terminal commitment to muscle fate. Muscle-specific genes, including myosin heavy chain (*MHC*) genes, are expressed in the last phase of this multi-regulated program, where mononucleated myo-


 Springer

Search  


Home Subjects My Springer Services Springer Shop About us

Cell Biology Home > Life Sciences > Cell Biology





SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS SERIES TEXTBOOKS REFERENCE WORKS  

 **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**



ISSN: 1071-2690 (print version)
Journal no. 11626



READ THIS JOURNAL ON SPRINGERLINK

Online First Articles 
All volumes & issues 
Free: Sample Articles 
Free Access to Top Papers 

FOR AUTHORS AND EDITORS

 2013 Impact Factor  1.000

In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal

Development of insulin resistance through induction of miRNA-135 in C2C12 cells
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IVAN-D-14-00250
Full Title:	Development of insulin resistance through induction of miRNA-135 in C2C12 cells
Article Type:	Articles (full research papers)
Keywords:	Insulin resistance, miR-135, Insulin receptor, C2C12
Corresponding Author:	masoud soleimani tarbiat modares university IRAN, ISLAMIC REPUBLIC OF
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	tarbiat modares university
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Maryam Honardoost
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Maryam Honardoost Mohammad reza Saroukhani Ehsan Arefian



Title

Author

Keywords

Issues

Home > Search Issue

Search Issue

1. CONFLICTING EXPRESSION PATTERN OF MIR-135 TARGET GENES DURING C2C12 DIFFERENTIATION 57-64
Maryam Honardoost¹, Masoud Soleimani², Ehsan Arefian³, Mohammad Reza Sarookhani⁴

Current Issue

Volume-4, Issue-3, March- 2015- In Press

Archive Issue

[read more](#)



CONFLICTING EXPRESSION PATTERN OF MIR-135 TARGET GENES DURING C2C12 DIFFERENTIATION

Maryam Honardoost¹, Masoud Soleimani², Ehsan Arefian³, Mohammad Reza Sarookhani⁴

¹PhD student of Molecular Medicine, Department of molecular Medicine, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. Department of Molecular Biology and Genetic Engineering, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran. Email: marymail_58@yahoo.com

²PhD of Hematology, Associated professor of Hematology, Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: soleim_m@modares.ac.ir

³PhD of Medical Virology, Assistant professor of Medical Virology, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: arefian@ut.ac.ir

⁴PhD of Biotechnology, DCLS -Dr of clinical laboratory sciences, Associated professor of Biotechnology, Department of molecular Medicine, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. Corresponding author: Tel +98 28 33336001, Mobile: +98 9121823059, Email address: Marymail_58@yahoo.com, msarookhani@qums.ac.ir

ABSTRACT: In this study, we aimed to evaluate miR-135 candidate target genes during myoblast to myocyte differentiation process. Using a bioinformatics approach, ADIPOR2, STXB4 and VAMP2 were selected as potential target of miR-135. Cell differentiation was induced by 3% horse serum. The expression level of genes were determined by qRT-PCR during differentiation process. The data about genes expression pattern during myoblast into myocyte differentiation demonstrated statistically significant down regulation of ROCK1, and STXB4 while ADIPOR2 and VAMP2 had upward expression level during the process. Seemingly, ADIPOR2 and VAMP2 are as potential regulators of myogenesis and involve in skeletal muscle development through mTOR/PI3K pathway, maintenance and development of muscle cells. Decreased expression of STXB4 and ROCK1 accompanied with overexpression of miR-135 (as its possible targets) could be involved in the control the vesicle translocation and membrane fusion, which is required for development of cells during myogenesis. all at once, it seems that, miR-135 could be involved in myogenesis via down regulation of STXB4 and ROCK-1 (as negative regulators) except for ADIPOR2 and VAMP2 which their over expression is essential for muscle cell differentiation.

Keywords: miRNA, Gene, C2C12 Differentiation.

INTRODUCTION

The process of myogenesis is extremely complex and requires a specific organization of signaling molecules, that regulates specific transcription, to activate particular gene and miRNAs expression (1,2). The fate of myogenic precursor, Myoblasts, is first determined by transcription factors, Pax3/Pax7, followed by regulation of myogenic differentiation (MyoD), and myogenic regulatory factors (MRFs) (3). MyoD is considered as a marker of terminal commitment to muscle fate.

The muscle differentiation is controlled by numerous signaling pathways such as PI3K/Akt/mTOR pathway (4). The PI3K/Akt/mTOR pathway promotes protein synthesis and is essential for myotube formation (5-7).



دانشگاه علوم پزشکی قزوین
Qazvin University of Medical Sciences

MiR-214 and miR-135 have conflicting expression pattern during C2C12 myoblast to myocyte differentiation

Maryam Honardoost^{1,2,3}, Mohammad reza Sarookhani^{1,2}, Ehsan Arefian⁴, Masoud Soleimani^{1,3,5}

¹ Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
² Cellular and Molecular Translational Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
³ Department of Molecular Biology and Genetic Engineering, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran
⁴ Department of Immunology, School of Biology, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran
⁵ Department of Biotechnology, School of Biotechnology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran



Introduction:

Vertebrate skeletal muscle is derived from the somites, the first metameric structures in mammalian embryos, that progressively subdivide into embryonic compartments, thus giving rise to dermomyotome and subsequently to myotome to produce differentiated muscular tissue. Myoblasts (immature muscle cells) exit from cell cycle after a defined proliferation time, to become terminally differentiated myocytes [1]. The fate of myogenic precursor cells is first determined by transcription factors, Pax3/Pax7, followed by regulation of highly conserved MyoD and MRF factors, expressed in the skeletal muscle lineage [1]. Muscle-specific genes such as myosin heavy chain genes (MHC genes) is expressed in the last phase of this multi-regulated program, where mononucleated myocytes specifically fuse to each other to form multinucleated myotubes [2]. The process of myogenesis is highly complex and requires a broad spectrum of signaling molecules, either during embryonic development and in postnatal life, that converges on specific transcription and chromatin-remodeling factors, as well as on regulatory RNAs, to activate gene and microRNA expression program [3,4].

Recently, microRNAs, a class of evolutionarily conserved and small non-coding RNAs [5], have emerged as novel and essential regulators of myogenesis [6]. They vary from 17 to 24 nucleotides in length and can induce mRNA degradation or translation inhibition by interacting with the 3' UTRs of their target mRNAs [5]. Muscle-specific microRNAs have a central role in myogenesis and several ubiquitously expressed microRNAs have also been found to participate in myogenesis [7,8].

Although increasing number of microRNAs are found to function in myogenesis, knowledge about individual roles of microRNAs in muscle development remains limited. In our study we found two more miRs which had special expression level during C2C12 differentiation process.

Materials and Methods

Cell Culture

C2C12 myoblasts (ATCC, Rockfeller, New York, NY, USA) were cultured in growth medium (GM, Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% fetal bovine serum) before induced to differentiation, at 37 °C, 5% CO₂. When cell density reached 70% they were digested with 0.25% trypsin, and then seeded into culture dishes. When inducing C2C12 myoblasts to differentiate, cell density must reach >90% prior to changing GM to differentiation medium (DM, Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 3% horse serum).

Results

miR-214 and -135 have different expression level during myoblast differentiation

Mouse myoblast cells proliferate in the presence of serum and differentiate upon partial serum deprivation from myoblast cells caused their differentiation into myocytes, confirmed by positive ICC result for specific skeletal marker, myosin. We carried out profiling of microRNAs and found that a miR-214 was downregulated and miR-135 was overexpressed more than 2-fold in differentiated cells. qRT-PCR analysis showed that miR-214 and miR-135 had significantly altered expression pattern during myoblast differentiation.



CERTIFICATE



This is to certify and confirm that

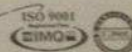
Maryam Honardoost
Has attended
10th Royan International Congress
on Stem Cell Biology & Technology
and presented the poster(s)
September 3-5, 2014 (24 hours)
Tehran – Iran

Congress Chairman
Mehdi Totonchi, Ph.D.

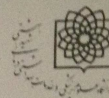
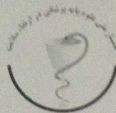
Mehdi Totonchi

President of Royan Institute
Hamid Gourabi, Ph.D.

H. Gourabi



Program Code: 1000750; Center Code: 11621
This certificate without Royan logo is invalid.



سومین سمپوزیوم نقش علوم پایه پزشکی در ارتقای سلامت

به نوبت گاهای می شود:

سرکار خانم مریم بهر دوست دگر بخ ۲۹ بهمن ۱۳۹۳ سومین سمپوزیوم نقش علوم پایه پزشکی در ارتقای سلامت در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پوستر تحت عنوان:

Genetic etiology of Insulin Resistance ارائه دادند.

این گاهای مختصر اجست نماید ارائه پوستر در برنامه فوق بود و جایگزین مدارک آموزشی و تخصصی نمی باشد.

دکتر علیرضا زالی
ویرایشی سمپوزیوم



دکتر منصوره جرجانی
رئیس سمپوزیوم